



# Etude multicentrique de nouveaux marqueurs tumoraux moléculaires dans les épanchements péritonéaux et le sang : analyse par PCR quantitative en temps réel

Fauzia Mohamed

## ► To cite this version:

Fauzia Mohamed. Etude multicentrique de nouveaux marqueurs tumoraux moléculaires dans les épanchements péritonéaux et le sang : analyse par PCR quantitative en temps réel. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2010. Français. NNT : 2010STET002T . tel-00672144

**HAL Id: tel-00672144**

**<https://theses.hal.science/tel-00672144>**

Submitted on 20 Feb 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JEAN MONNET DE SAINT ETIENNE

Thèse de doctorat en  
BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Présentée par

**Fauzia Mohamed**

ETUDE MULTICENTRIQUE DE NOUVEAUX MARQUEURS  
TUMORAUX MOLECULAIRES DANS LES EPANCHEMENTS  
PERITONEAUX ET LE SANG :  
ANALYSE PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

Soutenue publiquement le 18 Mai 2010 devant le jury composé de :

Dr Dominique BERNARD-GALLON	Rapporteur	Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand
Dr Stéphane ANSIEAU	Rapporteur	Centre Léon Bérard, Lyon
Pr Frédérique PENAULT-LLORCA	Examineur	Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand
Pr Pierre SEFFERT	Président	Université de Saint-Etienne
Dr Stéphane PAUL	Examineur	Université de Saint-Etienne
Pr Christian GENIN	Directeur de Thèse	Université de Saint-Etienne

*A ma mère*  
*A mon grand père*  
*A ma grand mère*

## REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé dans les laboratoires du CHU de St Etienne (laboratoire d'Immunologie, laboratoire d'Immuno-cytologie, laboratoire d'anatomopathologie, et majoritairement au laboratoire du GIMAP à la Faculté de Médecine.

Je remercie Monsieur le Professeur C. GENIN, Directeur de cette thèse, de m'avoir accueillie et encouragée pour effectuer mes manipulations dans son laboratoire.

Je remercie Madame le Docteur N. VINCENT d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail pratique de ma thèse de m'avoir initiée à la pratique de la biologie.

Je remercie Monsieur le Docteur S. PAUL de m'avoir aidée et conseillée pour ce travail.

Je remercie Madame D. BERNARD-GALLON et Monsieur S. ANSIEAU d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur P. SEFFERT qui a fourni les sérums des patientes de l'étude faisant l'objet de cette thèse et Madame le Docteur A. KHADDAGE qui a procédé à l'étude morphologique et immunohistochimique des prélèvements de sein.

Je remercie la technicienne, Madame F. DUPLAT, de m'avoir aidée pour ce travail expérimental ainsi que les autres techniciennes du laboratoire qui m'ont accueillie parmi elles avec gentillesse et bonne humeur et Mme C. MOULIN pour l'aide à la rédaction.

# Table des matières

<b>Abréviation .....</b>	<b>8</b>
<b>Figures .....</b>	<b>11</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>12</b>
<b>Summary.....</b>	<b>13</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>14</b>
<b>Rappels bibliographiques .....</b>	<b>17</b>

## I – Première partie : La recherche de cellules malignes dans le liquide péritonéal

<b><i>CHAPITRE I : Le péritoine et les épanchements péritonéaux .....</i></b>	<b>19</b>
<b>I - Le péritoine et la cavité péritonéale .....</b>	<b>19</b>
<b>I.1 – La structure du péritoine .....</b>	<b>19</b>
<i>I.1.1 - Feuillet viscéral .....</i>	<i>20</i>
<i>I.1.2 - Feuillet pariétal .....</i>	<i>21</i>
<b>I.2 – L'anatomie fonctionnelle .....</b>	<b>21</b>
<i>I.2.1 - La membrane séreuse, organe mécanique .....</i>	<i>22</i>
<i>I.2.2 - La membrane séreuse, organe de résorption .....</i>	<i>22</i>
<i>I.2.3 - La membrane séreuse, organe de défense .....</i>	<i>22</i>
<b>I.3 - La cavité péritonéale .....</b>	<b>22</b>
<b>II - Les épanchements péritonéaux .....</b>	<b>22</b>
<b>II.1 - Les cellules des épanchements péritonéaux .....</b>	<b>22</b>
<b>II.2 - Les étiologies des épanchements péritonéaux : .....</b>	<b>23</b>
<i>II.2.1 – Les ascites inflammatoires .....</i>	<i>23</i>
<i>II.2.2 – Les ascites des maladies cardiaques .....</i>	<i>23</i>
<i>II.2.3 – Les ascites néoplasiques .....</i>	<i>23</i>
<i>II.2.4 – Les causes exceptionnelles .....</i>	<i>24</i>

<b>CHAPITRE II : Le diagnostic d'un épanchement péritonéal malin.....</b>	<b>25</b>
<b>I - La détection des cellules tumorales .....</b>	<b>25</b>
<b>I.1 – Les caractéristiques des cellules tumorales .....</b>	<b>26</b>
<b>I.2 – La détection des cellules mésothéliales .....</b>	<b>26</b>
<b>I.3 - Les immuno-marquages des cellules tumorales .....</b>	<b>27</b>
<b>I.4 – Les principaux marqueurs des cellules tumorales .....</b>	<b>28</b>
<i>I.4.1 - L'Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM) .....</i>	<i>29</i>
<i>I.4.2 - L'Antigène CarcinoEmbryonnaire (ACE).....</i>	<i>31</i>
<i>I.4.3 - Les Claudines (CLDN) .....</i>	<i>32</i>
<i>I.4.4 - Les Cytokératines (CK) .....</i>	<i>34</i>
<i>I.4.5 - Les Mucines (MUC).....</i>	<i>36</i>
<i>I.4.6 - La Villine (VILL1).....</i>	<i>39</i>

## **II – Deuxième partie :**

### **La recherche des marqueurs tumoraux sériques dans le cancer du sein**

<b>I – Le diagnostic du cancer .....</b>	<b>42</b>
<b>I.1 – La mammographie .....</b>	<b>42</b>
<b>I.2 – L'échographie .....</b>	<b>43</b>
<b>I.3 – L'IRM .....</b>	<b>43</b>
<b>I.4 – La cytologie .....</b>	<b>43</b>
<b>I.5 – La biopsie .....</b>	<b>43</b>
<b>I.6 – Les marqueurs tumoraux .....</b>	<b>44</b>
<i>I.6.1 - Le cancer antigen ou carbohydrate antigen 15-3 (CA15-3) .....</i>	<i>44</i>
<i>I.6.2 - Le Her2 ou ErbB2 .....</i>	<i>45</i>
<i>I.6.3 - La Mammaglobine .....</i>	<i>47</i>
<i>I.6.4 – Les récepteurs hormonaux.....</i>	<i>48</i>
<i>I.6.5 – Les antigènes de prédisposition héréditaire : BRCA1 et BRCA2.....</i>	<i>49</i>

## **III – Troisième partie :**

### **Les techniques utilisées**

<b>I - La détection des cellules tumorales dans les épanchements malins....</b>	<b>53</b>
---	-----------

<b>I.1 – La cytologie conventionnelle.....</b>	<b>53</b>
<i>I.1.1 - La cytologie des cellules isolées (immunocytochimie) .....</i>	<i>53</i>
<i>I.1.2 - La cytologie des cellules tissulaires (immunohistochimie) .....</i>	<i>54</i>
<b>I.2 - La cytométrie en flux .....</b>	<b>56</b>
<b>I.3 - La biologie moléculaire .....</b>	<b>57</b>
<i>I.3.1 - La technique de PCR en temps réel .....</i>	<i>58</i>
<i>I.3.2 – Le principe de quantification par PCR en temps réel.....</i>	<i>59</i>
<i>I.3.3 - Les types de quantification par PCR en temps réel .....</i>	<i>61</i>
<i>I.3.4 – Les application de la RT-PCR en temps réel .....</i>	<i>62</i>
<i>I.3.5 – Les autres techniques de biologie moléculaire .....</i>	<i>63</i>
<i>I.3.5.1 - Le profil génomique par utilisation de puces à ADN .....</i>	<i>63</i>
<i>I.3.5.2 - La technique de séquençage à haut débit .....</i>	<i>64</i>
<i>I.3.5.3 - La technologie SEREX .....</i>	<i>65</i>
<i>I.3.5.4 - La protéomics.....</i>	<i>65</i>
<i>I.3.5.5 - La glycomics.....</i>	<i>65</i>
<b>II– La détection des marqueurs tumoraux dans le sang périphérique ...</b>	<b>66</b>
<b>II.1 - Les cellules cancéreuses circulantes .....</b>	<b>66</b>
<b>II. 2 - La localisation et le transport de l'ARNm dans les cellules.....</b>	<b>67</b>
<b>II.3 - Les caractéristiques et l'origine biologique de l'ARNm circulant .....</b>	<b>67</b>
<b>Partie Expérimentale .....</b>	<b>69</b>
<b><i>L'introduction du travail expérimental .....</i></b>	<b><i>70</i></b>
<b>I – Le positionnement et la pertinence biologique .....</b>	<b>70</b>
<b>II – Les objectifs de l'étude .....</b>	<b>71</b>
<b>III – L'obtention des prélèvements .....</b>	<b>71</b>
<b>IV – La mise au point des techniques utilisées dans ce travail .....</b>	<b>72</b>
<b>IV-1- La cytométrie en flux : mise au point des marquages quatre couleurs .....</b>	<b>72</b>
<i>IV.1.1 – La sélection des anticorps pour le marquage quatre couleurs .....</i>	<i>72</i>
<i>IV.1.2 – Le test du marquage quatre couleurs .....</i>	<i>74</i>
<i>IV.1.2.1 – Le marquage quatre couleurs pour les cellules d'origine</i>	

<i>gastro-intestinale</i> .....	74
IV.1.2.2 - <i>Le marquage des cellules d'origine gynécologique</i> .....	75
IV.1.3 – <i>Le marquage quatre couleurs sur les épanchements</i> .....	76
<b>IV.2- La biologie moléculaire : mise au point des techniques de RT-PCR quantitative..</b>	78
IV.2.1 – <i>La recherche d'un gène de ménage approprié</i> .....	78
IV.2.2 – <i>Le clonage dans le vecteur pDrive du gène de ménage RPLPO et</i> <i>préparation d'une gamme standard</i> .....	80
IV.2.3 – <i>La mise en place de la RT-PCR quantitative pour la quantification</i> <i>de l'ARNm de différents marqueurs tumoraux</i> .....	81
IV.2.3.1 – <i>Le dessin des amorces</i> .....	82
IV.2.3.2 – <i>La réalisation d'une courbe étalon pour chaque gène des</i> <i>marqueurs tumoraux</i> .....	83
IV.2.3.3 – <i>La mesure du niveau d'expression de l'ARNm circulant</i> <i>dans le sérum</i> .....	85
<b>Le premier article</b> .....	86
Introduction .....	86
Article publié dans Biomarkers.....	87
Conclusion et perspectives .....	97
<b>Le deuxième article</b> .....	99
Introduction .....	99
Article soumis .....	100
Conclusion et perspectives .....	118
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	120
Conclusion .....	121
Perspectives .....	124
<b>Bibliographie</b> .....	125



## Abréviations

ACE :	Antigène carcino-embryonnaire
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AE1/AE3:	Antibody directed against epithelial antigens
AR :	Androgen receptor
ARNm :	ARN messenger
BCA 225 :	Breast cancer antigens
Ber-EP4:	Ep-CAM (Ber-EP4 antigen); Monoclonal antibody
BRCA1 -BRCA2 :	Breast cancer 1-2 ( antigènes de prédisposition héréditaire )
BS106 :	Small mucin-like protein
BU101 :	Breast epithelium termed (Lipophilin B)
CA :	Cancer antigen
CCIS :	Carcinome canalaire in situ
CD45 :	Clusters of differentiation - anti-human leukocyte antibodies
CDX2 :	Caudal- type homeobox transcription factor 2
CK :	Cytokératine
CLDN :	Claudine
CMF :	Cytométrie en flux
CO17-1A:	Ep-CAM (CO17-1A antigen)
Ct :	Threshold cycle
EGF :	Epidermal growth factor
EGP :	Epithelial glycoprotein
EMA:	Epithelial membrane antigen
Ep-CAM:	Epithelial cell adhesion molecule
ER :	Oestrogène receptor
ERA :	Epithelial related antigen
ESA:	Ep-CAM (epithelial surface antigen)
ESR1 :	Estrogen receptor alpha
ESR2 :	Estrogen receptor beta
FAK :	Focal Adhesion Kinase
FITC :	Fluorescéine

GA733-2:	Ep-CAM (GA733-2 antigen)
GAPDH :	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GCDFP-15 :	Gross Cystic Disease Fluid Protein 15
GICA :	Gastro Intestinal Carbohydrate Antigen
HEA :	Human epithelial antigen
HER-2 ou ErbB2 :	Human epithelial growth factor receptor 2
hTERT :	Human telomerase reverse transcriptase
ICAM :	Intercellular adhesion molecule
ICC :	Immuno-cytochimie
IgC-like :	Immunoglobulin-constant region-like constant
IgV-like :	Immunoglobulin-variable region-like
IHC :	Immunohistochimie
IL-2:	Interleukin-2
IRM :	Interference reflection microscopy
K14 :	Cytokératine 14
K5:	Cytokératine 5
KSA1 / 4:	Antigen Ep-CAM-human pancarcinoma antigen
MCA :	Mucin-like carcinoma-associated antigen
MNF116:	Cytokeratin (CK) MNF116
MOC31:	Ep-CAM (MOC31 antigen); Monoclonal antibody
MUC:	Mucine
MUC1-EGFR:	Mucin1- epidermal growth factor receptor
MUC1–PEM :	MUC1–polymorphic epithelial mucin
N-CAM:	Neural Cell Adhesion Molecule
p53 :	p53 protein
PBMC :	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PE :	Phycoérythrine
PECY:	Phycoérythrine-Cyanine
PMIP :	Proapoptotic mitochondrial intermembrane proteins
PR :	Progesterone receptor
PS2–TFF1 :	Trefoil factor family
RPLPO :	Phospho–protéine ribosomale acide Po
RT-PCR :	Reverse-transcriptase PCR
SAGE :	Serial Analysis of Gene Expression

SEREX :	Serological analyses of recombinant cDNA expression libraries
SMAD4 :	Tumor suppressor gene
SSPM :	Massively parallel signature sequencing
TPS :	Tissue polypeptide-specific antigen
TTF-1 :	Thyroid transcription factor-1

## Figures :

**Figure 1 :** *Le péritoine et la cavité péritonéale*

**Figure 2 :** *La structure du péritoine*

**Figure 3 :** *Le feuillet viscéral*

**Figure 4 :** *Le feuillet pariétal*

**Figure 5 :** *Structure de l'antigène Ep-CAM.*

**Figure 6 :** *Structure membranaire des claudines.*

**Figure 7 :** *Localisation des claudines*

**Figure 8 :** *Mammographie*

**Figure 9 :** *Expression de l'antigène MUC-4 dans les cellules isolées d'effusion péritonéale de cancer de l'ovaire*

**Figure 10 :** *Aspect des cellules malignes tissulaires*

**Figure 11 :** *Schéma du principe de la cytométrie de flux*

**Figure 12 :** *Schéma de la réaction de RT-PCR*

**Figure 13 :** *Le niveau du bruit de fond correspond au seuil de détection ou cycle seuil Ct*

**Figure 14 :** *Les anticorps sélectionnés selon l'origine tissulaire.*

**Figure 15 :** *Spécificité du marquage quatre couleurs sur des lignées cellulaires d'origine gastro-intestinale.*

**Figure 16 :** *Spécificité du marquage quatre couleurs sur des lignées cellulaires d'origine gynécologique.*

**Figure 17 :** *Comparaison de l'expression de plusieurs gènes de ménage dans les cellules de liquides péritonéaux de 15 patients.*

**Figure 18 :** *Reproductibilité des résultats obtenus avec le gène RPLPO*

**Figure 19 :** *Le vecteur pDrive*

**Figure 20 :** *Résultats de PCR quantitative en temps réel de la gamme de plasmide RPLPO.*

**Figure 21 :** *Calcul de la droite de référence montrant le niveau de fluorescence exprimé en ct en fonction du log du nombre de copies.*

**Figure 22 :** *Courbe de dissociation pour l'amplicon RPLPO*

**Figure 23 :** *Electrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose révélés sous UV au bromure d'éthidium.*

**Figure 24 :** *Clonage dans le vecteur pDrive et vérification des clones par digestion par l'enzyme de restriction EcoRI.*

## Résumé :

La progression naturelle des tumeurs consiste en une extension locale, puis à distance (métastase) par migration de cellules dans le sang et la lymphe vers des sites secondaires. Il est donc primordial de pouvoir détecter des cellules tumorales circulantes en plus de l'analyse morphologique et de l'immunocytochimie. De plus, deux technologies (cytométrie en flux et RT-PCR quantitative en temps réel) sont adaptées pour une analyse automatisée, rapide et sensible d'une très faible quantité de cellules.

Le but de notre travail a été de mettre au point des systèmes de détection pour l'identification de cellules cancéreuses dans les épanchements péritonéaux et dans le sang. L'étude des biomarqueurs moléculaires apparaît comme une approche complémentaire intéressante pour améliorer l'efficacité du diagnostic dans ce type d'échantillons biologiques. Nous nous sommes intéressés à la mise en évidence de nouveaux marqueurs tumoraux qui pourront être utilisés pour le diagnostic précoce et le pronostic des cancers en utilisant les nouvelles techniques de biologie moléculaire. Il est probable que l'utilisation de multiples marqueurs moléculaires puisse permettre d'évoquer plus particulièrement certains types de cancers.

Nous avons pu mettre en place une technique de PCR quantitative en temps réel, nettement plus sensible que la cytologie classique, et nous avons appliqué cette technique à l'étude de marqueurs tumoraux dans les liquides d'épanchement, mais aussi dans le sang pour rechercher et doser l'ARN messager.

Nos résultats montrent que la cytométrie en flux adaptée à des lignées cellulaires ne l'est pas pour des prélèvements cliniques. Par la PCR quantitative, il a été possible de quantifier le niveau d'expression des marqueurs tumoraux étudiés en utilisant des plasmides de référence qui ont été préparés pour chaque gène.

Plusieurs marqueurs permettent de différencier des épanchements malins et des épanchements bénins, mais surtout les antigènes CLDN4 et Ep-CAM étaient significativement plus élevés (68% et 57%, respectivement) chez les patients avec épanchements malins. L'ARN messager circulant de la CLDN4 était détectable et significativement plus élevée dans les sérums de patients atteints de cancer du sein (64%  $p < 0,05$ ).

Les résultats indiquent que l'utilisation d'une combinaison de marqueurs comportant la claudine 4 est plus susceptible de détecter des cellules malignes et d'être utiles pour le suivi de patients.

## Summary

### **Multicentric study of new molecular tumor markers in the peritoneal effusions and in the blood: analysis using quantitative real-time RT-PCR.**

The natural progression of tumors is a local extension, and remotely (metastasis) by migrating cells in the blood and the lymph to secondary sites. It is therefore essential to detect circulating tumor cells in addition to morphological analysis and immunocytochemistry. In addition, two technologies (flow cytometry and RT-PCR in real time) are suitable for a rapid and sensitive automated analysis of a very small quantity of cells.

The aim of our work was to develop detection systems for identification of cancer cells in peritoneal effusions and blood. The study of molecular biomarkers appears as an attractive complementary approach to improve the efficiency of diagnosis in this type of biological samples. We are interested in the identification of new tumor markers that can be used for early diagnosis and prognosis of cancer using new techniques of molecular biology. It is likely that the use of multiple molecular markers can help to raise some specific types of cancers.

We were able to develop a quantitative PCR technique in real time, significantly more sensitive than conventional cytology, and we applied this technique to the study of tumor markers in effusions, but also in blood for detecting messenger RNA.

Our results show that flow cytometry well-adapted to cell lines, is not unusable for clinical specimens. For quantitative PCR, it was possible to quantify the expression levels of tumor markers using reference plasmids prepared for each gene.

Several markers can differentiate malignant and benign effusions, but especially CLDN4 and Ep-CAM antigens were significantly higher (68% and 57% respectively) in patients with malignant effusions.

The circulating CLDN4 mRNA was detectable and significantly higher in the sera of patients with breast cancer (64%  $p < 0.05$ ).

The results indicate that using a combination of markers including claudin 4 is more likely to detect malignant cells and be useful for monitoring patients.

# INTRODUCTION

De nombreux cancers s'accompagnent d'épanchements malins. La détection de cellules tumorales dans les épanchements est encore manuelle, laborieuse, opérateur-dépendante, peu sensible (60-70%) et peu spécifique, et elle pose actuellement des difficultés d'interprétation au cytopathologiste. En cas de malignité, il est important de définir le type de la tumeur afin d'orienter rapidement la stratégie diagnostique et thérapeutique. Dans les épanchements inflammatoires pauvres en cellules malignes, celles-ci sont difficilement détectables au milieu du grand nombre de cellules mésothéliales et de macrophages.

Afin d'améliorer l'efficacité de la détection et du diagnostic tumoral, d'autres méthodes complémentaires sont nécessaires pour augmenter la sensibilité de la cytologie.

Les épanchements fournissent un matériel de qualité pour les tests moléculaires. Cependant, les marqueurs disponibles sont extrêmement limités.

L'identification précise des biomarqueurs peut offrir de nouvelles voies pour la détection précoce du cancer et pour l'évaluation du risque d'évolutivité.

Nous nous sommes intéressés à deux techniques de détection de cellules.

La cytométrie en flux permet une analyse rapide du phénotype malin (1000 cells/sec), cellule à cellule, quantitative et multiparamétrique. Elle est utilisée de façon extensive pour les leucocytes, normaux ou tumoraux. Par contre, elle est très peu utilisée pour les tumeurs solides.

La cytométrie est basée sur la détection de marqueurs couplés à des fluorochromes. De nombreux anticorps existent pour les leucocytes, couplés avec plusieurs fluorochromes permettant plusieurs combinaisons. Il a ainsi été possible de définir de nombreux phénotypes cellulaires de significations différentes.

La cytométrie en flux est une technique qui permet de caractériser quantitativement les cellules tumorales à partir de plusieurs paramètres combinés. Cependant, les rares anticorps spécifiques de marqueurs tumoraux disponibles, sont rarement validés en cytométrie et encore plus rarement couplés à des fluorochromes.

La biologie moléculaire par RT-PCR quantitative en temps réel permet une détection extrêmement sensible des transcrits de gènes. Les nouvelles techniques de PCR quantitatives permettent de mesurer le niveau d'expression de ces transcrits. Actuellement, la technique de « real-time quantitative PCR » est la plus prometteuse pour accroître la spécificité et la sensibilité de la détection des transcrits ARNm.

L'analyse de l'expression génique repose sur l'extraction des ARN messagers extrêmement fragile. L'ARNm est extrait des cellules, transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par une



réaction de transcription inverse et amplifié de façon exponentielle par PCR. La quantité de produits de PCR est mesurée, en utilisant un agent intercalant fluorescent ou une sonde d'hybridation spécifique couplée à un fluorochrome. Le niveau de fluorescence est détecté en temps réel pendant le déroulement de la réaction. Le niveau de fluorescence visible à l'écran est directement proportionnel, de façon exponentielle, à la quantité d'ADNc initiale. Le nombre minimum de cycles requis pour obtenir une croissance linéaire de fluorescence est une relation logarithmique avec la concentration initiale en ADNc.

La qualité de l'ARNm extrait du prélèvement est validée par l'analyse de gènes exprimés de façon ubiquitaire (gènes domestiques) avec un niveau d'expression comparable dans toutes les cellules, telles que la  $\beta$ -actine, la GAPDH ou la phospho-protéine ribosomale acide Po (RPLPO). La quantité relative d'ADNc spécifique du récepteur est généralement rapportée à la quantité d'ADNc d'un de ces gènes domestiques.

Mon travail de thèse a consisté à développer une technique (RT-PCR) pour l'étude des marqueurs tumoraux dans les épanchements malins et dans le sérum de patients atteints de cancers du sein. Les résultats de ces tests moléculaires ont ensuite été comparés avec les données cliniques.

L'identification et l'amplification des ARNm libres dans le sérum ou le plasma pourrait être une nouvelle approche pour améliorer les outils classiques d'identification des maladies et peut être un marqueur intéressant pour la détection précoce des cellules cancéreuses.

# **RAPPELS**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**

# **Première partie :**

## **La recherche de cellules malignes dans le liquide péritonéal**

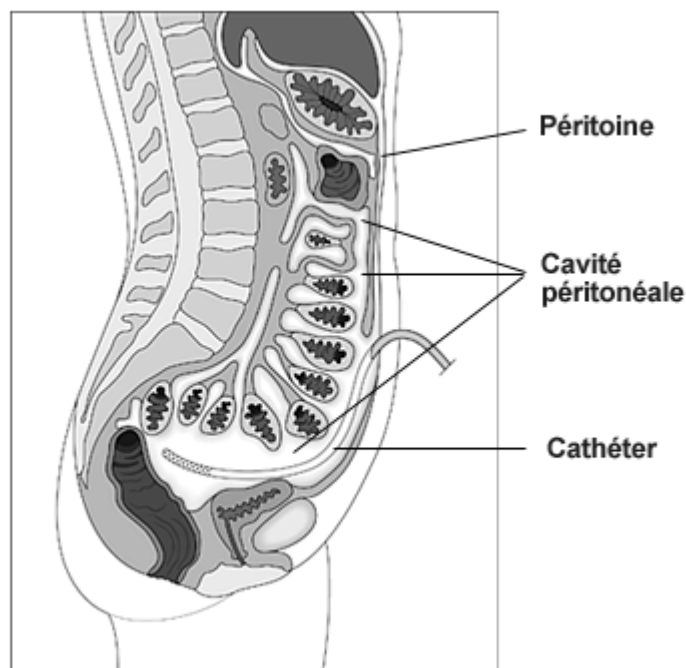
# CHAPITRE I : *Le péritoine et les épanchements péritonéaux*

## I - Le péritoine et la cavité péritonéale

Le péritoine est une membrane séreuse continue (formée par une couche simple de cellules épithéliales), qui tapisse entièrement les parois de la cavité abdomino-pelvienne et ses viscères (figure 1), et qui enveloppe en totalité ou en partie les organes qui y sont contenus, c'est à dire l'appareil digestif et les organes génitaux féminins. Il comprend 2 feuillets en continuité l'un avec l'autre (cette précision est importante pour bien comprendre ce qu'est un organe rétropéritonéal, péritonisé et intrapéritonéal) :

*Le péritoine viscéral (qui tapisse l'extérieur des organes).*

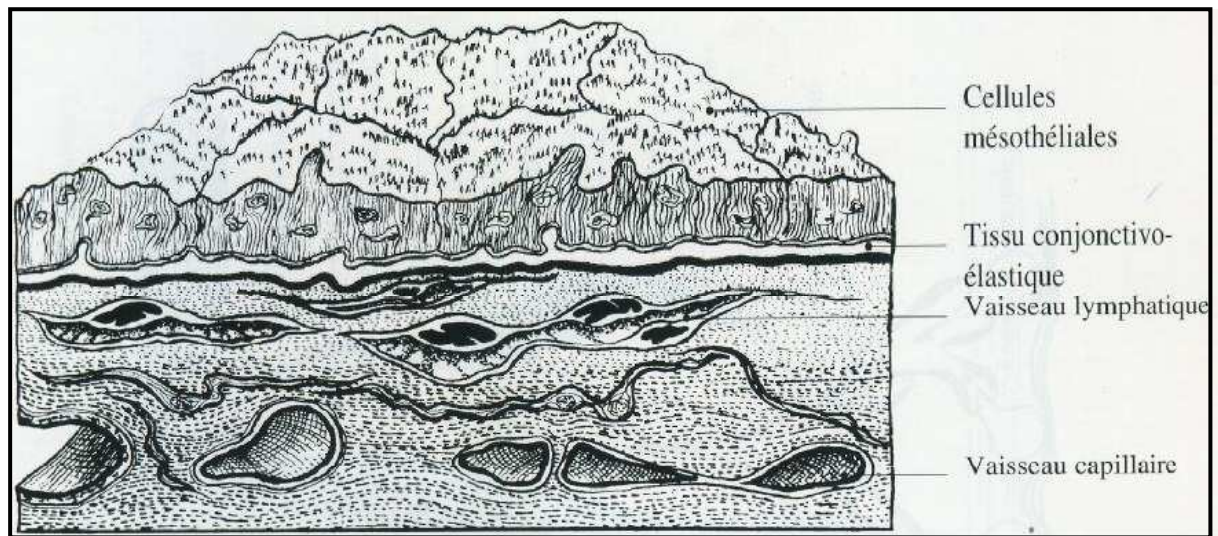
*Le péritoine pariétal (qui tapisse la face interne des parois de l'abdomen).*



**Figure 1 :** *Le péritoine et la cavité péritonéale*

### I.1 – La structure du péritoine

- Les membranes séreuses sont constituées par un mésothélium reposant sur une couche de tissu conjonctif.
- L'ensemble repose sur un tissu sous-séreux riche en terminaisons nerveuses et en vaisseaux sanguins et lymphatiques (figure 2).



**Figure 2 :** *La structure du péritoine*

### ***1.1.1 – Le feuillet viscéral***

Ce feuillet tapisse la face superficielle des différents viscères abdominaux (figure 3).



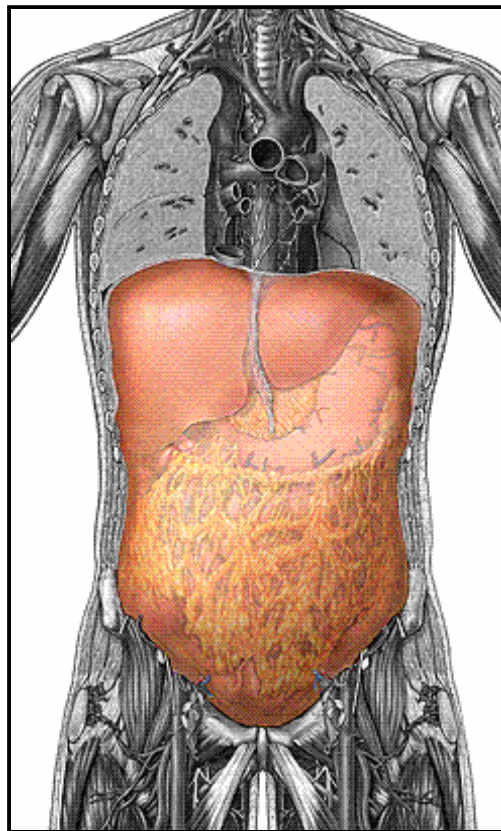
**Figure 3 :** *Le feuillet viscéral*

### ***I.1.2 – Le feuillet pariétal***

Le feuillet pariétal tapisse la face profonde de la cavité abdominopelvienne (figure 4). Il distingue :

- une partie diaphragmatique
- une partie antérieure
- une partie postérieure
- une partie pelvienne

Le péritoine pariétal antérieur : Il tapisse la face antéro-latérale de l'abdomen.



**Figure 4 :** *Le feuillet pariétal*

Le péritoine pariétal postérieur tapisse la paroi abdominale postérieure, mais il est séparé d'elle par un espace rétro-péritonéal où se trouvent les organes rétro-péritonéaux (gros vaisseaux, appareil urinaire).

## **I.2 – L'anatomie fonctionnelle**

Le péritoine a plusieurs fonctions telles que maintenir les organes en place afin qu'ils ne se précipitent pas vers le bassin ou bougent avec les mouvements de l'individu, servir de

structure porteuse aux vaisseaux et nerfs des organes ; assurer le glissement harmonieux des viscères grâce à une mince lame lubrifiante qu'il contient. Ce liquide péritonéal existe en quantité minime chez le sujet sain.

### ***1.2.1 - La membrane séreuse, organe mécanique***

C'est un véritable espace de glissement, cet espace est représenté par la cavité lubrifiée par une faible quantité de liquide.

- La disparition pathologique de cet espace (adhérences infectieuses ou épanchements importants) compromet le fonctionnement normal des viscères recouverts.
- Par les mésos et les ligaments, elle constitue des moyens de fixité des viscères.

### ***1.2.2 - La membrane séreuse, organe de résorption***

C'est une membrane dont les facultés de résorption sont remarquables.

- Cette faculté d'absorption est mise à profit en particulier pour l'absorption de certains médicaments.

### ***1.2.3 - La membrane séreuse, organe de défense***

Elle assure la défense des organes contre les micro-organismes (microbes) grâce à l'existence de nombreuses cellules histiocytaires et lymphocytaires.

## **I.3 - La cavité péritonéale**

Cette cavité est théoriquement vide à l'exception d'une fine couche liquidienne qui permet aux surfaces séreuses de rester humides. Le liquide péritonéal provient de deux sources principales : un trans-sudat d'origine plasmatique et, chez la femme, un ex-sudat d'origine ovarienne (par exemple, lors de l'ovulation). Les autres sources du liquide péritonéal incluent les sécrétions macrophagiques et, chez la femme, les sécrétions tubaires, les menstruations rétrogrades (*Oral E 1996*) .

## **II - Les épanchements péritonéaux**

L'ascite est un épanchement liquidien intra-abdominal.

### **II.1 - Les cellules des épanchements péritonéaux**

Le liquide péritonéal (ascite) contient une grande variété de cellules à l'état libre dont les cellules mésothéliales desquamées à partir de la membrane péritonéale et des cellules



immunitaires : macrophages, cellules NK, lymphocytes, polynucléaires, mastocytes. Normalement, les macrophages sont les cellules les plus abondantes, autour de 85 % ([Ho HN 1997](#)) tandis que les lymphocytes représentent 20 à 30 % des cellules du liquide péritonéal ([Oosterlynck DJ 1992](#)). L'ascite est le témoin d'une inflammation du péritoine ou d'une localisation tumorale.

Le diagnostic précoce d'invasion péritonéale est crucial pour la survie du patient car le traitement peut être adapté à la tumeur primitive ([Hassan R 2006](#); [Fukumoto Y 2006](#); [Koppe MJ 2006](#)). Le diagnostic peut être particulièrement utile dans les formes très précoces, (ex bilan per-opératoire de résection tumorale) où les micro-invasions sont recherchées par lavage du résidu péritonéal ([Tamura N 2007](#); [Wang JY 2005](#)).

## **II.2 – Les étiologies des épanchements péritonéaux :**

L'ascite est alors le témoin d'une localisation tumorale ou d'une inflammation du péritoine. Les étiologies principales sont :

### ***II.2.1 – Les ascites inflammatoires***

Elle est le plus souvent secondaire à une tuberculose génitale ou caecale. La cirrhose fait partie des maladies hépatiques que l'on retrouve le plus fréquemment (80%) à l'origine de la survenue d'ascite. Il s'agit avant tout de la maladie alcoolique, de l'hépatite virale B ou C et de l'hépatite médicamenteuse. Les autres variétés de cirrhose sont moins souvent mises en cause.

### ***II.2.2 – Les ascites des maladies cardiaques***

C'est la conséquence d'une élévation de la pression veineuse centrale entraînant une stase veineuse à partir des cavités droites. L'insuffisance de fonctionnement de la pompe cardiaque proprement dite (insuffisance cardiaque), secondairement à l'existence d'un blocage de la circulation sanguine au niveau du foie, est une des causes extrapéritonéales de l'ascite.

### ***II.2.3 – Les ascites néoplasiques***

Les ascites provoqués par une tumeur maligne correspondent à 10 % des cas d'ascites et peuvent être entraînés par divers types de tumeurs.

Elles peuvent survenir dans le contexte des rares tumeurs primitives du péritoine (carcinome séreux, tumeur desmoplastique à petites cellules, psammocarcinome, mésothéliome et pseudomyxome) ou dans le cadre de métastases de diverses tumeurs à distance : les plus fréquentes sont les cancers de l'ovaire, les cancers digestifs (estomac, colon, pancréas) et



les cancers hépatiques. Les carcinoses péritonéales métastatiques représentent 6 000 cas annuels en France.

#### ***II.2.4 – Les causes exceptionnelles***

- Mésothéliome (acide hyaluronique augmenté dans le liquide)
- Hypothyroïdie
- Insuffisance rénale terminale (dialisés)
- Gastroentérite à éosinophiles (riche en éosinophiles)
- Syndrome de Demons-Meigs (associé à une tumeur ovarienne)
- Maladie gélatineuse du péritoine (associée à une tumeur mucineuse)
- Ascite urinaire (plaies chirurgicales ou traumatiques des uretères) : diagnostic par l'opacification des voies urinaires.

## CHAPITRE II : *Le diagnostic d'un épanchement péritonéal malin*

### I - La détection des cellules tumorales

La détection et l'identification des cellules malignes primitives ou métastatiques représentent les objectifs principaux de l'examen cytologique des épanchements. La cytologie est la technique standard la plus utilisée mais sa sensibilité n'est que de 60 % pour la détection des cellules malignes.

Dans des situations complexes, telles que le diagnostic différentiel entre hyperplasie mésothéliale et tumeurs malignes (métastases, mésothéliomes) ou entre réaction lymphocytaire et lymphome, ou du diagnostic des épanchements inflammatoires pauvres en cellules malignes, il est difficile d'identifier avec précision les cellules malignes. Les cellules malignes sont difficilement détectables au milieu du grand nombre de cellules mésothéliales et de macrophages dans les effusions. De plus, les cellules mésothéliales ont la particularité d'être fortement activées dans les épanchements ce qui entraîne une hyperprolifération et des changements nucléaires et cytoplasmiques qui peuvent les faire ressembler à des cellules malignes (*Davidson B 1999*). Les critères cyto-morphologiques sont parfois insuffisants pour porter avec certitude un diagnostic. Dans ce cas, le diagnostic cytologique peut être complété par une étude immunocytochimique. L'examen morphologique sur lame après coloration de Papanicolaou et de May Grünwald Giemsa permet d'abord de repérer les cellules suspectes ou franchement malignes et l'utilisation d'anticorps spécifiques de divers marqueurs peut aider ensuite à mieux caractériser ces cellules mais cette technique reste peu sensible.

D'autres techniques complémentaires peuvent être mises en œuvre (microscopie électronique, cytométrie de flux...).

Cette étape diagnostique nécessite finalement le plus souvent un geste invasif pour permettre une étude anatomopathologique après cytoponction percutanée ou même biopsie chirurgicale sous laparoscopie. La présence éventuelle de ces marqueurs tumoraux dans les cellules tumorales circulantes ou même dans le plasma simplifierait beaucoup le diagnostic.

Nous souhaitons développer la technique de PCR quantitative en temps réel pour l'étude des marqueurs tumoraux dans les épanchements malins et dans le sang qui reste peu utilisée en routine car difficile à mettre en place. Nous pourrions alors comparer nos résultats avec les données cliniques.

## **I.1 – Les caractéristiques des cellules tumorales**

Les cellules tumorales sont caractérisées par des modifications de l'homéostasie : augmentation de la prolifération, baisse de l'apoptose, perte de capacité d'organisation tissulaire, tendance à la migration et à l'invasion tissulaire. De plus, une faible proportion de ces cellules peut migrer dans les liquides biologiques qui drainent la tumeur : sang, lymphe, épanchement inflammatoire. Les cellules migrantes peuvent essaimer dans les ganglions ou d'autres sites tissulaires et éventuellement développer des tumeurs filles (métastases). Le processus carcinogène s'accompagne de troubles de la duplication génomique avec de nombreuses erreurs, d'abord au niveau génique puis au niveau macroscopique (chromosomique). Les anomalies génomiques s'accompagnent d'expression inhabituelle de marqueurs. Une protéine anormale peut être présente à la surface de la cellule sans être une oncoprotéine car le nombre de gènes mutés susceptibles de conduire au développement de cancers est plus important que prévu. En fait, à côté des mutations « driver » conduisant aux cancers, tous les types de cellules présentent beaucoup plus de mutations « passagers » qui sont exprimées transitoirement ([Greenman C 2007](#)). Enfin, il est également possible d'observer des marquages aberrants de glycoprotéines habituellement exprimées par d'autres types tissulaires. Ces variations d'expression ont été bien documentées dans une bibliographie riche, en immuno-histochimie.

Du point de vue morphologique, les cellules tumorales présentent des atypies avec augmentation de leur taille, composition de leur contenu cytoplasmique et taille relative de leur noyau.

Dans le contexte de cancer, les cellules tumorales sont toujours associées à des cellules inflammatoires, parfois majoritaires, notamment dans les épanchements péritonéaux. Ces cellules doivent donc être distinguées des cellules d'origine épithéliale. Contrairement aux cellules épithéliales, toutes les cellules inflammatoires expriment le CD45 et pas l'Ep-CAM.

## **I.2 – La détection des cellules mésothéliales**

Les cellules mésothéliales d'origine mésenchymateuse ne présentent pas de marqueurs de la lignée hématopoïétique (CD45) contrairement aux lymphomes. La cytokératine est généralement positive. Si l'EMA et la vimentine peuvent être positifs, les autres marqueurs épithéliaux (ESA, HEA, EGP-2) sont toujours négatifs. Par contre elles semblent être

reconnues par des anticorps monoclonaux spécifiques (HBEM-1) et par les anticorps anti-thrombomoduline ([Nance KV 1991 ; Manning LS 1991](#)).

### **I.3 - Les immuno-marquages des cellules tumorales**

L'identification des cellules peut bénéficier de la détection de marqueurs à la surface de la membrane ou dans le cytoplasme de ces cellules ([Alix-Panabière C 2005](#)). Ce sont des antigènes résultants de mutation ou des antigènes surexprimés ou des antigènes avec modification post-traductionnelles. Quelques anticorps sont disponibles pour la caractérisation des cellules épithéliales. Ils ont été validés pour les techniques d'immunohistologie. Certains sont plus spécifiques de tumeurs digestives (CA19.9, ACE, Villine.), d'autres de tumeurs d'origine ovarienne (CA125) ou mammaire (CA 15.3). Toutes les cellules d'origine épithéliale expriment des marqueurs communs à ce type tissulaire : Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), human epithelial antigen (HEA) ou encore Epithelial related antigen (ERA).

Plusieurs autres marqueurs immunohistochimiques ont été utilisés pour différencier les tumeurs primaires. CDX2 et le facteur de transcription de la thyroïde 1 (TTF-1) sont considérés comme des marqueurs sensibles pour le cancer de l'adénocarcinome colorectal et pulmonaire. La combinaison de l'expression de cytokératine (CK7 et CK20) est aussi utile pour le diagnostic des différentes origines de l'adénocarcinome. MUC2, MUC5AC, SMAD4, le récepteur des œstrogènes (ER), et le Gross Cystic Disease Fluid Protein 15 (GCDFP-15) ont été détectés dans différents adénocarcinomes ([Seog-Yun Park MD 2007](#)).

### **I.4 – Les principaux marqueurs des cellules tumorales**

Un marqueur tumoral peut être défini comme une molécule modifiée qualitativement ou quantitativement dans les cellules cancéreuses. Cette molécule peut être de l'ADN, de l'ARNm et surtout une protéine. Ces marqueurs tumoraux peuvent être exprimés dans différents cancers ou être spécifiques d'une origine tissulaire précise (tableau1).

Nous nous attacherons principalement à décrire les marqueurs tumoraux spécifiques des tumeurs d'origine épithéliales.

Les marqueurs tumoraux cités sont limités à ceux étudiés dans le cadre de nos études.

**Tableau 1 : Récapitulatif des principaux marqueurs utilisés en clinique**

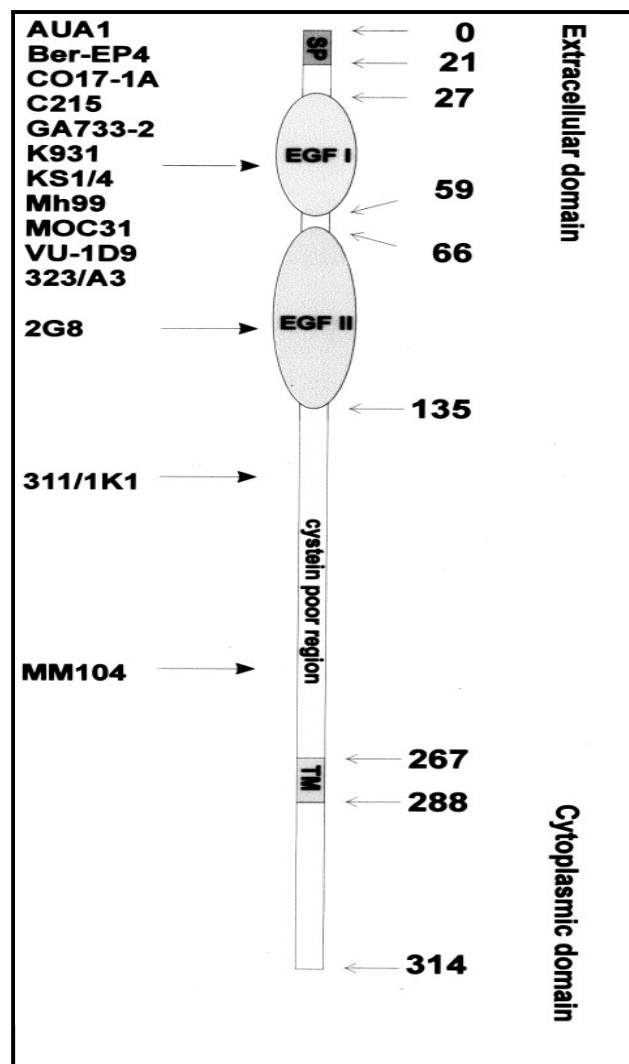
<b>PATHOLOGIE</b>	<b>TYPE DE MARQUEUR UTILISABLE</b>	<b>NOM DE MARQUEUR</b>
<b>- TUMEURS DU COLON ET DU RECTUM</b>	ACE - CA19-9	Antigène Carcino-Embryonnaire - Cancer Antigen 19-9
<b>- TUMEURS DE L'ESTOMAC ET DU PANCREAS</b>	ACE – CA19-9	Antigène Carcino-Embryonnaire - Cancer Antigen 19-9
<b>- TUMEURS DU SEIN</b>	ACE – CA15-3	Antigène Carcino-Embryonnaire - Carbohydrate Antigen ou Cancer Antigen 15-3
<b>- TUMEURS DE LA PROSTATE</b>	PSA - PAP	Antigène Spécifique de la Prostate - Phosphatase Acide Prostatique
<b>- TUMEURS DE L'OVAIRE</b>	CA125 - ACE	Cancer Antigen 125 - Antigen Carcino-Embryonnaire
<b>- TUMEURS DE L'APPAREIL DE REPRODUCTION</b>		
<i>Tumeurs du testicule</i>	AFP	Alphafoetoprotéine
<i>Tumeurs germinales de l'ovaire</i>	βHCG	Beta-Hormone Chorionique Gonadotrope
<i>Tumeurs placentaires</i>	βHCG	
<b>- TUMEURS BRONCHIQUES PRIMITIVES</b>		
<i>Adénocarcinomes</i>	ACE	Antigène Carcino-Embryonnaire
<i>Cancers à petites cellules</i>	NSE	Neurone Spécifique Enolase
<i>Cancers épidermoïdes</i>	Cyfra 21-1 SCC	Cytokératine 19 fragment antigen 21-1 Squamous Cell Carcinoma
<b>TUMEURS DU FOIE</b>	AFP	Alphafoetoprotéine
<b>- TUMEURS DE LA THYROÏDE</b>		
<i>Cancer médullaire de la thyroïde</i>	TCT - ACE	Thyro-Calcitonine - Antigène Carcino-Embryonnaire
<i>Epithélioma cellulaire de la thyroïde</i>	Thyroglobuline	
<b>- MYELOME MULTIPLE</b>	Immunoglobulines Beta 2 Microglobulines	
<b>- TUMEURS ORL</b>	Antigène SCC	Squamous Cell Carcinoma
<b>- TUMEURS INFILTRANTES DE LA VESSIE</b>	TPA	Tissue Polypeptide Antigen

#### ***1.4.1- L'Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM)***

##### ***Structure et fonction***

La molécule a d'abord été appelée par des noms différents tels que EGP40, CO17-1A, KSA1 / 4, ESA, GA733-2, MOC31, Ber-EP4. ([Winter MJ 2003](#)).

L'Ep-CAM est une protéine transmembranaire constituée de 314 acides aminés, codée par le gène GA733-2. ([Winter MJ 2003](#) ; [Kun-he Zhang 1 2007](#)). Il est composé d'un domaine extracellulaire contenant deux molécules de facteur de croissance épidermique (EGF) et un court domaine intracellulaire contenant 26 acides aminés dans lequel deux sites de liaison à l'actinine sont présents pour établir une liaison avec le cytosquelette d'actine (figure 5) ([Balzar M 1998](#) ; [Osta WA 2004](#); [Winter MJ 2003](#)).



**Figure 5 :** Structure de l'antigène Ep-CAM. (d'après [Manon, J Am J. Pathol. 2003](#))

SP : peptide signal ; EGF, EGF-like domain ; TM : transmembranaire. Les chiffres indiquent les résidus d'acides aminés délimitant les régions.

Il a été montré qu'Ep-CAM a des activités variées qui favorisent la progression du cancer et des métastases.

La fonction biologique de l'antigène Ep-CAM, si tous les domaines sont présents, est d'inhiber puissamment les cathepsines, la famille des cystéines protéases fréquemment produites par les cellules tumorales et connues pour être impliquée dans les métastases ([Baeuerle PA 2007](#)).

Ep-CAM joue un rôle dans l'adhésion, la signalisation, la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires ([Trzpis M 2007](#) ; [Baeuerle PA 2007](#)). Son expression accrue est étroitement associée à une prolifération cellulaire, favorisant l'adhérence cellule-cellule. Les cellules épithéliales humaines exprimant Ep-CAM réduisent leur dépendance aux facteurs de croissance et augmentent leur métabolisme et la formation de colonies. L'inhibition de l'expression d'Ep-CAM par un mRNA anti-sens réduit la prolifération et le métabolisme des cellules cancéreuses humaines. Le domaine intra-cellulaire est essentiel pour cet effet ([Munz M 2005](#)). Les études en cours recherchent le rôle d'Ep-CAM comme inhibiteur des protéases liées aux membranes, une fonction qui peut servir à protéger les cellules tumorales de leurs propres cathepsines sécrétées durant les métastases ([Pauli C 2003](#)). Bien qu'habituellement, ce soit une molécule pro-adhésive, dans le cancer Ep-CAM peut fonctionner comme un antagoniste de la E-cadhérine par la rupture de la liaison alpha-caténine/F-actine et altérer les adhésions étroites cellules-cellules ([Schmidt DS 2004](#)).

### ***Spécificité tumorale***

L'antigène Ep-CAM a été identifié comme un antigène spécifique de tumeur exprimé à la surface basolatérale de presque tous les épithéliums néoplasiques ([Balzar M, 1999](#)), à l'exception des épithéliums squameux ([Litvinov SV 1994](#); [Litvinov SV 1994](#); [De Boer CJ 1999](#)). L'antigène Ep-CAM est considéré comme un marqueur des états précancéreux. ([Litvinov SV 1996](#)). Des lésions dysplasiques du côlon ont montré la surexpression d'Ep-CAM sur la membrane basolatérale mais également apicale des cellules.

Ep-CAM apparaît donc comme un marqueur des cellules épithéliales très utile pour les examens pathologiques et peut maintenant être considéré comme l'un des antigènes les plus fortement exprimés par les tumeurs épithéliales.

Ep-CAM est impliquée dans l'adhésion cellulaire et a été la cible de traitement par des anticorps dans plusieurs essais cliniques. Pour évaluer la valeur de l'antigène Ep-CAM comme une nouvelle cible thérapeutique du cancer du sein, des études ont été effectuées par

RT-PCR en temps réel afin de quantifier le niveau d'expression de l'ARNm d'Ep-CAM dans les tissus mammaires normaux, les tumeurs primaires et les cancers du sein métastatiques. Ces études suggèrent une valeur pronostique de l'Ep-CAM qui est surexprimée 100 - 1000 fois dans les tissus des tumeurs primaires et métastatiques du sein ([Cimino A 2009](#)). Des études récentes en immunohistochimie, analysant des échantillons provenant de patients atteints de cancer du sein, de prostate, des ovaires, du poumon, du côlon, du rein et de l'estomac, ont montré l'utilité potentielle de l'Ep-CAM comme cible d'immunothérapie pour le traitement des cancers les plus fréquents chez l'homme ([Spizzo G 2006](#) ; [Spizzo G 2004](#)).

#### ***I.4.2 - L'Antigène CarcinoEmbryonnaire (ACE)***

##### ***Structure et fonction***

L'Antigène CarcinoEmbryonnaire (ACE) est une glycoprotéine de masse moléculaire de 180-200 kDa comprenant 60% de glucides. Il appartient à la superfamille des immunoglobulines. L'ACE est un des marqueurs tumoraux les plus anciens comportant 7 domaines extracellulaires dont un domaine N-terminal de 108 acides aminés homologues au domaine variable de l'immunoglobuline (IgV-like) et les six domaines homologues au domaine constant de l'immunoglobuline (IgC-like) ([Thompson JA 1991](#); [Hinoda Y 1990](#) ; [Thomas P 1990](#) ).

La famille de l'ACE comprend 29 gènes, dont 18 sont exprimés, 7 appartenant au sous-groupe de l'ACE et 11 au sous-groupe des glycoprotéines spécifiques. L'ACE est attaché à la membrane cellulaire par du glycosyl phosphatidylinositol et est probablement libéré sous forme soluble par une phospholipase C ou phospholipase D ([Duffy MJ 2001](#) ; [Hammarstrom S 1999](#)).

L'ACE est l'un des marqueurs tumoraux les plus répandus et certainement le plus fréquemment utilisé sous forme protéique comme marqueur dans les cancers gastro-intestinaux, en particulier dans le cancer colorectal ([Goldstein MJ 2005](#)), et d'autres tel le cancer du sein, de l'ovaire et de la prostate ([Mathelin C 2006](#)). Plusieurs membres du sous-groupe de l'ACE possèdent des propriétés d'adhésion cellulaire et le membre principal, la glycoprotéine biliaire, semble jouer un rôle dans la régulation de la transduction du signal, éventuellement en association avec d'autres sous-membres de la famille de l'ACE ([Hammarström S 1999](#)).

Il a été suggéré que l'ACE pourrait agir comme une molécule d'adhérence. Des modifications dans l'adhérence cellulaire étant impliquées dans les métastases, il a été suggéré *in vitro* que



l'ACE peut jouer un rôle dans ces processus. Bien que les données *in vitro* impliquent l'antigène ACE dans l'adhérence cellulaire ([Hammarstrom S 1999](#); [Thompson JA 1991](#); [Duffy MJ 2001](#)), sa localisation à la surface apicale des entérocytes matures du côlon humain normal est difficile à concilier avec ce rôle. D'autre part, il a été suggéré que l'ACE peut jouer un rôle dans la protection du côlon contre les infections microbiennes, peut-être en se liant et en piégeant des micro-organismes infectieux.

### ***Spécificité tumorale***

L'antigène ACE est présent dans l'intestin, le foie, le pancréas d'embryons ou de fœtus humains au cours des deux premiers mois de grossesse et est absent dans des tissus sains adultes. Il est généralement présent dans la plupart des adénocarcinomes tels ceux du tube digestif, le sein, le poumon mais pas dans les cancers du rein, de la thyroïde, de la prostate, de l'ovaire, du mésothéliome, des lymphomes ni du mélanome. Il est présent à des taux très faibles dans la muqueuse du colon et dans la glande mammaire, et est détectable dans le sérum de sujets sains en particulier chez les fumeurs. L'ARNm ACE a été détecté dans le lavage péritonéal de patients atteints de cancer gastrique ([Zhang YS 2006](#)).

Il a été suggéré que la surexpression de l'ACE dans les carcinomes pouvait interférer avec la différenciation cellulaire. En effet, l'expression ectopique de l'ACE dans des myoblastes de rat bloque leur différenciation ([Eidelman FJ 1993](#)). Une autre étude a montré que l'expression ectopique de l'ACE dans des cellules de mélanome induisait la surexpression de MUC18 et la diminution de l'expression de N-CAM, associé à l'acquisition du pouvoir métastatique.

Ainsi, l'antigène ACE est présent dans le plasma de plus de 80% des cancers colorectaux métastatiques et environ 50% des non métastatiques. De plus, l'ACE peut être détecté dans 12% des cancers du sein non métastatiques et 35 à 40% dans des cancers en phase métastatique. L'élévation d'ACE sérique est corrélée à la progression tumorale ([Lumachi F 2004](#) ; [Jung M 2009](#)).

### ***1.4.3 - Les Claudines (CLDN)***

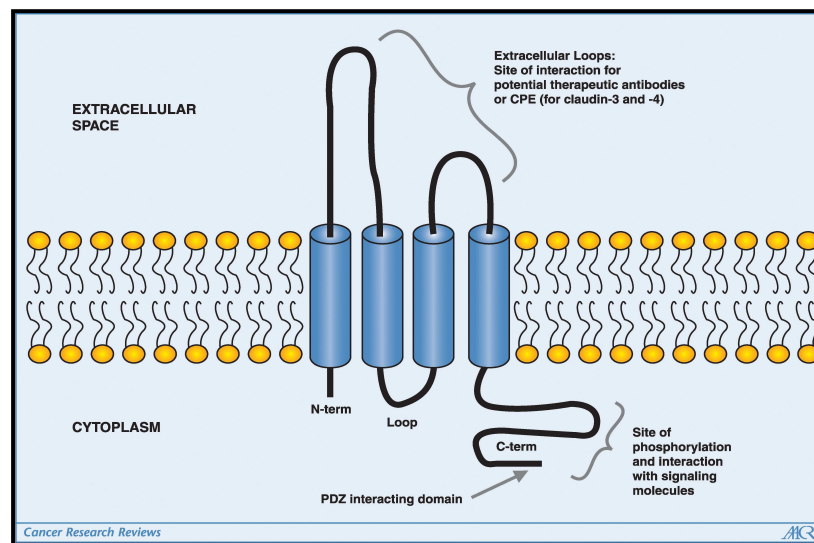
#### ***Structure et fonction***

Les claudines (CLDN), beaucoup moins étudiées, forment une famille d'environ 24 molécules d'adhésion impliquées dans la formation des jonctions serrées par les cellules épithéliales ([Tsukita S 2000a](#); [Tsukita S 2000b](#); [Lim TS 2008](#); [Krause G 2008](#)). Elles ont quatre domaines transmembranaires, les parties N-terminale et C-terminale dans le

cytoplasme (figure 6). Elles jouent un rôle dans le contrôle du flux de molécules dans l'espace intercellulaire entre les cellules épithéliales et elles sont très importantes dans l'établissement de la barrière paracellulaire ( [Tsukita S 2000b](#) ; [Krämer F 2000](#) ; [Hewitt KJ 2006](#)).

La combinaison des différents types de claudines à l'intérieur du tissu pourrait déterminer la sélectivité et la force des jonctions serrées.

Indépendamment de leurs fonctions précises dans les cellules cancéreuses, l'absence d'expression des claudines dans les cellules cancéreuses entraîne la perte de l'adhérence de ces cellules, une progression des cellules vers une forme métastatique, l'augmentation de leur pouvoir d'invasion et l'absence de différenciation des cellules cancéreuses.



**Figure 6 :** *Structure membranaire des claudines.* (d'après : [Morin PJ, Cancer Res 2005](#))

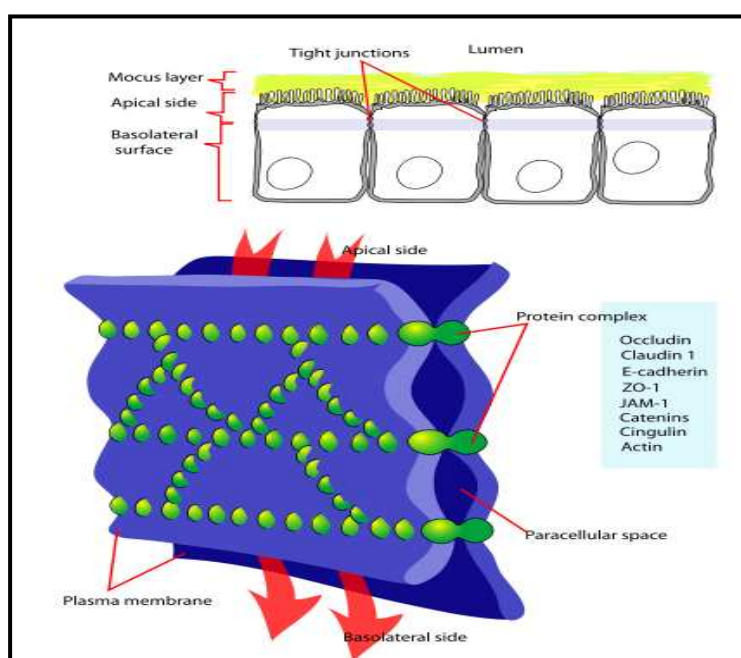
Les boucles extracellulaires pourraient servir de cibles pour la thérapie par des anticorps monoclonaux. La partie C-terminale contient le domaine PDZ et joue un rôle dans la transduction du signal et la fixation.

### ***Spécificité tumorale***

Des études récentes ont montré que l'expression du gène des claudines est fréquemment altérée dans divers cancers ([Morin PJ 2005](#) ; [Swisshelm K 2005](#)). Par exemple, l'expression des CLDN3 et CLDN4 est souvent augmentée dans les tumeurs de l'ovaire, du sein, de la prostate et du pancréas ([Michl P 2001](#) ; [Rangel LB 2003](#) ; [Kominsky SL 2004](#) ; [Agarwal R 2005](#) ; [Soini Y 2006](#)). L'expression de la CLDN7 est diminuée dans le cancer du sein et le cancer de la tête et du cou, mais plus élevée dans le cancer de l'estomac. Néanmoins, son

utilité n'a jamais été étudiée dans le diagnostic des épanchements malins par PCR quantitative et par cytométrie en flux. CLDN1 est typiquement diminuée dans divers cancers, mais elle a également été signalée comme étant élevée surtout dans les cancers digestifs.

Par ailleurs, des études précliniques ont montré que les CLDNs sont localisées à la surface cellulaire des cellules cancéreuses et sont surexprimées dans ces cellules (figure 7). Elles peuvent donc représenter des cibles utiles pour différentes stratégies thérapeutiques ([Kominsky SL 2006](#)). Par exemple, l'expression de la CLDN1 a montré une valeur pronostique dans le cancer du colon ([Resnick MB 2005](#)), CLDN18 dans le cancer de l'estomac ([Sanada Y 2006](#)), et CLDN10 dans le carcinome hépatocellulaire ([Cheung ST 2005](#)).



**Figure 7:** Localisation des claudines (d'après : [Rüffer C, Eur J Cell Biol 2004](#))

#### ***1.4.4 – Les Cytokératines (CK)***

##### ***Structure et fonction***

Les cytokératines sont les principaux filaments intermédiaires du cytosquelette des tissus épithéliaux normaux et des tumeurs (d'une largeur d'environ 10 nm) ([Tamura N 2007; Yeh CS 2006 ; Kodera Y 2005](#)). Ce sont des marqueurs protéiques structuraux spécifiques des cellules épithéliales et des études récentes indiquent leur implication dans la progression du cancer ([Makino 2009](#)). Les profils d'expression des cytokératines permettent de déterminer l'origine d'une tumeur maligne ([Lugli A 2008](#)). Plusieurs isoformes existent et sont distribuées différemment selon l'origine tissulaire. Les cellules adénocarcinomeuses gardent souvent

leur expression de cytokératines qui peuvent être visualisées dans le cytoplasme par immunocytochimie. Des anticorps sont dirigés contre tous les types de cytokératines (anticorps AE1/AE3 ou MNF116) ou spécifiques d'isoformes, notamment de faibles poids moléculaires (cytokératines 7, 8).

Les cytokératines peuvent être classées en deux groupes : les cytokératines de type I, qui sont acides, et les cytokératines de type II, qui sont basiques ou neutres et plus longues que celles de type I.

Généralement, les cytokératines s'assemblent en fonction de leur type et on trouve des couples type I - type II, par exemple, le couple K5/K14 dans la couche basale de l'épiderme.

### ***Spécificité tumorale***

Le profil d'expression des cytokératines dépend du développement embryonnaire et du degré de différenciation cellulaire.

L'expression des cytokératines est habituellement conservée dans les cellules néoplasiques, l'utilisation des anticorps spécifiques est importante pour déterminer l'origine des cancers métastatiques grâce à des techniques immunohistochimiques. La cytokératine constitue un marqueur histochimique de la différenciation des cellules épithéliales. Le profil d'expression des divers types de cytokératine (CK) de tumeurs de différentes localisations peuvent être essentiels pour déterminer l'origine d'une tumeur maligne ([Lugli A 2008](#)).

La cytokératine 7 (CK7) se retrouve dans de nombreux épithéliums canaux et glandulaires, notamment dans le poumon, le sein, les ovaires et l'endomètre. Récemment, les profils combinés d'expression de CK7 et CK20 ont été largement étudiés dans les différents carcinomes primaires et métastatiques. Il a également été montré que CK8, CK18 et CK19 sont exprimés dans certains cancers gastro-intestinaux ([Lee MJ 2003](#)).

La cytokératine 19 (CK19) est une protéine de 40 kDa qui fait partie du cytosquelette des cellules épithéliales. Cette protéine de filaments intermédiaires est largement exprimée par l'ensemble des cellules épithéliales et représente un indicateur utile de la différenciation épithéliale ([Marrakchi R 2008](#)). De faibles niveaux de CK19 ont été détectés dans des cellules endothéliales et des fibroblastes.

L'antigène CK19 est largement utilisé comme biomarqueur pour la détection de la diffusion de cellules tumorales dans le sang et la moelle osseuse et sa positivité est considérée comme un indicateur pronostique chez les patients cancéreux. Il est considéré comme un marqueur prometteur pour la détection de cellules cancéreuses du sein, cependant, son rôle dans la

progression du cancer du sein reste inconnu (*Fabisiewicz A 2004 ; Daskalaki A 2009 ; Van der Auwera I 2010*).

La cytokératine 20 (CK20) est une protéine épithéliale exprimée presque exclusivement au niveau gastro-intestinal et elle est largement utilisée comme marqueur immunohistochimique pour les diagnostics de routine. Plusieurs études ont rapporté que l'antigène CK20 et l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) sont des gènes cibles fiables pour la détection de cellules disséminées du cancer colorectal (*Wang JY 2006 ; Xu D 2006; Chen CC 2006; Shen C 2008*). Cependant, CK20 n'est pas considérée comme un marqueur pour la classification des tumeurs car certaines études ont rapporté que le gène CK20 a une faible sensibilité et spécificité (*Gradilone A 2003*).

#### ***1.4.5 - Les Mucines (MUC)***

##### ***Structure et fonction***

Les mucines sont une grande famille de glycoprotéines de haut poids moléculaire (entre 250 et 500 kDaltons) hautement glycosylées (*Schmid BC 2002 ; Obermair A 2002 ; Levitin F 2005, Decremoux P 2000 ; Patton S 1995*), abondantes qui sont présentes à l'interface entre différents épithéliums et leur environnement extracellulaire. Elles sont exprimées par les cellules épithéliales. Elles sont classées en deux catégories principales: liées à la membrane telles : MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13 et MUC17, et sécrétées ou formant un gel telles : MUC2, MUC5AC, MUC5B et MUC6. Elles partagent toutes les mêmes caractéristiques structurales mais elles sont distinctes dans leur répétition en tandem d'acides aminés surtout pour les différentes isoformes de MUC1. Les mucines sont impliquées dans la régulation des diverses activités cellulaires à la fois dans des conditions normales et pathologiques. Plusieurs de ces mucines sont connues pour former des couches de mucus, responsables de ses propriétés viscoélastiques et gélifiantes, tandis que d'autres forment le glycocalyx sur les entérocytes intestinaux. Elles jouent un rôle surtout physique de défense des surfaces épithéliales.

Plusieurs données soutiennent aussi la participation des mucines dans des processus biologiques plus complexes tels que le renouvellement des cellules épithéliales et la différenciation, la signalisation cellulaire et l'adhérence cellulaire. Des études ont révélé le rôle des mucines dans la pathogenèse du cancer, ce qui souligne l'importance de connaissances approfondies de la biologie des mucines (*Andrianifahanana M 2006*).

L'activité des mucines et leur localisation est médiée par plusieurs mécanismes moléculaires, y compris les interactions avec d'autres protéines. Une compréhension approfondie de la biochimie à l'origine des interactions connues entre mucines et autres protéines, associées à leur signification physiopathologique, peut donner un aperçu du développement de nouveaux agents thérapeutiques. En effet, une étude a démontré qu'un inhibiteur de cellules perméables, le PMIP, qui perturbe l'interaction de la MUC1-EGFR, est efficace pour tuer les cellules cancéreuses du sein in vitro et dans des modèles tumoraux ([Senapati S 2009](#); [Jia Y 2010](#)).

### ***Spécificité tumorale***

De nombreuses isoformes existent et sont exprimées de manière différente dans les tissus normaux ou tumoraux. L'expression anormale de mucines a été rapportée dans le développement du cancer, en influençant la croissance cellulaire, la différenciation, la transformation, l'adhérence, l'invasion et l'immunosurveillance.

Des études immunologiques et biochimiques montrent la possibilité d'identifier plusieurs gènes de mucines telles MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC7 et que certaines de ces mucines sont exprimées dans les cellules et les tissus de manière spécifique. Un profil d'expression anormal de ces molécules est observé dans diverses tumeurs malignes. Ces études montrent que l'antigène MUC1 est le meilleur marqueur pour caractériser les mucines. Il est exprimé sur la surface apicale polarisée des cellules épithéliales, et exprimé dans les glandes mammaires, le pancréas, l'épithélium foveolaire superficiel ([Lee HS 2001](#) ; [Dekker J 2002](#) ; [Tarp MA 2007](#)), la vésicule et les adénocarcinomes colorectaux.

Le gène de l'antigène MUC1 a été le plus étudié, il existe plusieurs isoformes de MUC1, générées par épissage alternatif ([Hartman M 1999](#), [Smorodinsky N 1996](#)).

- La plus longue isoforme (MUC1/REP) possède un très grand domaine extracellulaire composé de 20 à plus de 100 motifs répétés en tandem selon le polymorphisme génétique de chaque individu.
- Il existe trois autres isoformes (MUC1/X, MUC1/Y, MUC1/Z) dont le domaine extracellulaire ne contient pas la partie répétée et ils diffèrent par les sites accepteurs de l'épissage alternatif à la fin de l'exon 2.
- La dernière isoforme, soluble, est MUC1/SEC qui possède le même domaine extracellulaire que MUC1/REP mais ne possède pas de région transmembranaire et cytoplasmique.

Les mucines jouent un rôle de défense des surfaces épithéliales en servant de barrières physiques. Leur haut degré de glycosylation protège des attaques microbiennes et de la protéolyse. MUC1 peut également diminuer l'adhérence de cellule à cellule et des cellules à la matrice (*Ligtenberg MJ 1992 ; Miksicek RJ 2002*). MUC 1 assure une protection dans les voies aériennes et digestives. Il est principalement exprimé à la surface apicale de la plupart des épithéliums simples surtout sur des cellules épithéliales mammaires. MUC1 pourrait être impliqué dans la transduction du signal.

Le gène de MUC1 est souvent amplifié et surexprimé dans les cellules cancéreuses. MUC1 est associé aux adénocarcinomes tels que l'adénocarcinome du sein ou de l'ovaire (avec 9 isoformes). La présence de ces molécules est un facteur de mauvais pronostic en particulier pour les isoformes D, A, X, Y, Z.

Le gène de MUC2 code une mucine sécrétoire gélatineuse typique, qui représente la forme prédominante dans l'intestin et le colon chez l'homme. Les gènes MUC4, MUC5AC et MUC5B ont été isolés à partir du tissu bronchique. Le MUC4 et le MUC5AC sont principalement exprimés dans les voies respiratoires et dans la muqueuse gastrique et génitale, tandis que MUC5B est fortement décelable seulement dans les glandes bronchiques. Le MUC6 est exprimé par les tissus gastriques (*Seregni E 1997a ; Seregni E 1997b*).

L'antigène CA125 codé par le membre le plus récent de la famille des protéines MUC, l'antigène MUC16, a été caractérisé à partir d'une séquence d'ADN codant pour une mucine qui est depuis longtemps connue comme marqueur de cancer de l'ovaire. C'est donc un antigène fréquent dans les cancers épithéliaux de l'ovaire, plus particulièrement de type séreux. Cependant il peut être détecté dans le sérum chez les sujets en bonne santé en fonction du cycle ovarien et dans d'autres localisations comme les tumeurs mammaires. Il existe aussi dans le lait, le mucus cervical, les poumons et les voies respiratoires. Sa fonction cellulaire est mal connue.

CA125 est une glycoprotéine hétérogène de poids moléculaire élevé appartenant au groupe des mucines. Ce déterminant est exprimé pendant le développement embryonnaire, il s'agit donc d'un marqueur oncofœtal.

Le CA19-9 aussi appelé GICA (Gastro Intestinal Carbohydrate Antigen) est une sialoglycoprotéine portée par une protéine de type mucine (*Loy TS 1993*).

Le dosage de CA19-9 soluble est très utilisé pour détecter et suivre le cancer du colon et du pancréas avec une sensibilité de 70%. De plus, le sialyl Lwis<sup>a</sup> paraît être un indicateur du pouvoir métastatique des tumeurs pancréatiques, urothéliales et colorectales ([Magnani JL 2004](#)).

#### ***I.4.6- La Villine (VILL1)***

##### ***Structure et fonction***

La Villine est une protéine localisée dans les microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes et des cellules du tubule proximal du rein. Elle joue un rôle important dans la plasticité épithéliale induite par différents stimuli. Elle est liée à l'actine et régule son activité contractile selon la concentration en calcium.

##### ***Spécificité tumorale***

La suppression de l'expression de la Villine dans des cellules épithéliales coliques qui expriment normalement cette protéine, empêche l'assemblage de la bordure en brosse. Sa distribution est modifiée dans la transformation cellulaire et constitue de ce fait un marqueur de choix des états préneoplasiques et néoplasiques du colon.

Quelques études ont montré que la villine pourrait être un marqueur du tractus gastrointestinal ([Prasad NB 2005](#) ; [George SP 2007](#) ; [Xi L 2005](#)).



# **Deuxième partie :**

## **La recherche des marqueurs tumoraux sériques dans le cancer du sein**

Les cancers du sein sont la principale cause de décès chez la femme dans le monde, et son diagnostic précoce et son traitement sont d'une importance primordiale. Plus d'un million de nouveaux cas surviennent chaque année, dont plus de 580 000 dans les pays développés (Europe de l'ouest, Amérique du nord) où il est plus fréquent qu'en Afrique ou en Asie. Il est responsable chaque année de plus de 400 000 décès. (*Institut National Du Cancer, Cancer du sein 2008*).

En France il concerne environ une femme sur onze. Chaque année sont découverts environ 33 000 nouveaux cas des cancers du sein. Il est responsable d'environ 11 000 décès par an. Les cancers du sein peuvent toucher plus rarement l'homme (moins de 1 %). Environ 10 % des cancers du sein surviennent avant l'âge de 40 ans, 25 % avant 50 ans et 50 % avant 65 ans. L'âge moyen du diagnostic est 61 ans. Cette maladie est hétérogène avec des morphologies, profils moléculaires, comportement et réponse clinique au traitement différents. (*Kamangar F 2006 ; Polyak K 2007 ; Bosch A 2010 ; Thind A 2009*).

Lorsque les cancers du sein ne sont pas traités, les cellules tumorales se propagent localement et envahissent les organes de voisinage. Elles peuvent également disséminer par voie sanguine ou lymphatique pour atteindre les organes situés à distance (métastases). Les organes les plus fréquemment atteints par les métastases sont les os, les poumons, le foie et le cerveau.

Au premier stade, les cancers du sein sont trop petits pour être détectés par la palpation des seins ou par les examens de dépistage (mammographie, échographie). Il ne présente à ce stade aucun symptôme. Lorsque les cellules cancéreuses continuent à se développer, la tumeur devient souvent visible sur les examens de dépistage, sans être encore palpable cliniquement.

La détection précoce et le traitement aboutissent souvent à la guérison. En l'absence de dépistage ou de traitement précoce, les cellules continuent à se développer et la tumeur devient palpable. Plus le stade de détection est tardif, plus le traitement est lourd et les chances de guérison diminuent. Au cours des dernières décennies, le traitement des cancers du sein a beaucoup progressé notamment par l'utilisation de traitements adjuvants endocriniens (médicaments antagonistes), la suppression ovarienne et la chimiothérapie adjuvante (*Thomas E 2003 ; Buzdar AU 2005 ; Buzdar AU 2007 ; Bosch A 2010*)..

Le pronostic est estimé au moment du diagnostic, en fonction des facteurs classiques : âge, taille tumorale, grade clinique, envahissement ganglionnaire et degré d'expression des récepteurs aux estrogènes et progestérone. Leur valeur est confirmée par les conférences

internationales de consensus. Mais ces facteurs sont encore insuffisants pour prédire de façon fiable les rechutes. Les rechutes sont encore fréquentes, même en cas de traitement maximal : 30% pour des tumeurs sans envahissement ganglionnaire. De nouveaux facteurs pronostiques ou prédictifs sont nécessaires pour individualiser les traitements complémentaires.

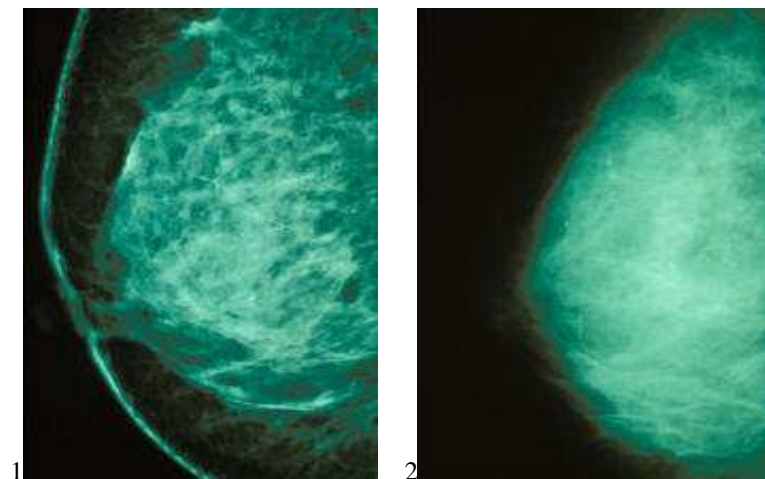
## **I - Le diagnostic du cancer**

Plus le diagnostic est précoce et plus les chances de guérison sont grandes. Seul l'examen anatomo-pathologique (modifications tissulaires et cellulaires mises en évidence sur une biopsie) de la tumeur permet de confirmer le diagnostic de cancer.

Le diagnostic des cancers du sein se fait par l'examen histologique d'un fragment du tissu tumoral. Les autres examens telles que la mammographie ou l'échographie mammaire servent au dépistage des cancers du sein, et permettent également l'évaluation de la taille de la tumeur et son stade. Mais seul l'examen histologique peut le confirmer avec certitude.

### **I.1 - La mammographie**

C'est l'examen essentiel dont la sensibilité est de l'ordre de 80 %. L'image classique des cancers du sein est une opacité stellaire à contours flous, sans liseré péri-lésionnel, de volume inférieur au volume palpé. Il peut exister une réaction ou un épaissement cutané en regard de la lésion. Le troisième élément sémiologique fondamental est l'existence de microcalcifications inférieures à 5 mm qui doivent être recherchées sur des clichés en agrandissement ; elles constituent le critère de diagnostic essentiel des cancers infra-cliniques (Figure 8).



**Figure 8 :**

*1-Mammographie. Axillographie gauche externe. Densité homogène. Ganglions axillaires liposcléreux.*

*2-Mammographie normale. Le parenchyme mêlé de fibrose prédomine dans les régions centrales et latérales. Radiotransparence diffuse homogène de l'aire mammaire.*

## **I.2 - L'échographie**

C'est un complément qui actuellement paraît très utile, surtout en cas de sein dense, chez la femme jeune, où la mammographie est peu sensible. Elle permet de différencier les masses liquidiennes des masses tissulaires et constitue un guide précieux pour les ponctions.

## **I.3 - L'IRM**

Elle n'est indiquée qu'en cas de difficulté d'analyse des lésions par les explorations classiques ou dans l'exploration des seins préalablement traités par chirurgie conservatrice.

## **I.4 - La cytologie**

Les cellules prélevées sont examinées au microscope pour savoir s'il s'agit d'un cancer. Cet examen n'est cependant pas suffisant en général pour affirmer le diagnostic et il est alors nécessaire d'effectuer une biopsie.

## **I.5 - La biopsie**

L'examen histologique correspond à l'examen des cellules au microscope pour savoir si elles sont ou non cancéreuses.

Trois types principaux de prélèvements histologiques existent : cytoponction à l'aiguille fine, microbiopsie, ou drill biopsie. Ces prélèvements sont habituellement réalisés sous guidage échographique ou mammographique (biopsie stéréotaxique), ce qui permet d'améliorer leur performance.

Les carcinomes représentent 98 % des tumeurs malignes du sein. On distingue les carcinomes non infiltrants des carcinomes infiltrants.

Les carcinomes non infiltrants (15 %)

- Les carcinomes intra-canalaires (ou galactophoriques in situ) n'infiltrent pas la membrane basale et le tissu conjonctif. Ils sont souvent considérés comme une maladie diffuse de tout l'arbre galactophorique et sont caractérisés par leur multicentricité. La multicentricité est la présence de lésions disséminées dans les différents quadrants du sein. La multifocalité est la présence de plusieurs foyers dans un même quadrant du sein.

- les carcinomes lobulaires in situ sont une prolifération bénigne d'excellent pronostic (qui fait réfuter par certains le terme de carcinome). Les lésions sont fréquemment multicentriques et bilatérales, découvertes sur pièce de biopsie pour d'autres lésions.

Le diagnostic de carcinome in situ est difficile : il ne faut pas méconnaître un éventuel carcinome micro-invasif ou invasif. Aussi est-il nécessaire d'établir une étroite collaboration entre les différents praticiens impliqués (radiologue, chirurgien, anatomo-pathologiste, radiothérapeute).

Les carcinomes infiltrants (75 %)

Les carcinomes canaux infiltrants sont retrouvés dans 70 % des cas ; ils peuvent être plus ou moins différenciés.

Les carcinomes lobulaires infiltrants sont retrouvés dans 5 à 15 % des cas, et sont fréquemment associés à des foyers de carcinome lobulaire in situ.

## **I.6 - Les marqueurs tumoraux**

L'identification de marqueurs tumoraux adaptés à la détection précoce du cancer est très prometteuse pour améliorer les résultats cliniques des patients. Récemment, il est apparu un grand intérêt pour l'exploration du génome et du protéome de biomarqueurs dans un but de diagnostic moléculaire et ils pourraient servir de cibles pour la thérapeutique.

Les cancers du sein pourront être diagnostiqués plus rapidement et avec beaucoup plus de précision grâce aux nouveaux marqueurs moléculaires (*Sikaroodi M 2010*).

Les marqueurs protéiques circulants sont des molécules sécrétées ou libérées par les cellules tumorales ou par leur environnement et plus ou moins spécifiques de celles-ci. Pour le cancer du sein, l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) a été pendant longtemps le seul marqueur circulant testé. Actuellement, les marqueurs les plus utilisés sont ceux qui mesurent le niveau circulant de fragments de MUC1-*polymorphic epithelial mucin* (MUC1-PEM) qui est fréquemment exprimé dans les tissus de cancer du sein:

### ***I.6.1- Le cancer antigen ou carbohydrate antigen 15-3 (CA15-3)***

Il reconnaît une glycoprotéine de type mucine (MUC-1) et il est largement utilisé comme marqueur tumoral pour les cancers du sein. Son niveau augmente dans le sérum à la phase métastatique (50-80%) (*Bensouda Y 2009 ; Martin A 2006*), mais actuellement, le CA15-3 n'est pas recommandé pour le dépistage ou le diagnostic de cancer du sein et son application

principale est de surveiller la réponse au traitement chez les femmes atteintes d'un cancer métastatique.

Le CA15-3 codé par le gène MUC1 est sécrété par les cellules épithéliales glandulaires mais peut être détecté dans le cytoplasme des cellules métastatiques de cancer du sein de façon inversement proportionnelle au degré de différenciation cellulaire. Quelques études immunohistologiques ont mis en évidence du CA15-3 cytoplasmique dans 87% des tumeurs malignes primaires du sein et dans près de 100% des cancers métastatiques du sein alors qu'il n'est présent que sur la bordure apicale des cellules épithéliales différenciées dans les tumeurs mammaires bénignes.

Le taux de CA15-3 sérique est corrélé au stade de la maladie, à la taille de la tumeur primitive, à l'extension ganglionnaire et au nombre des ganglions atteints. Des valeurs préthérapeutiques de CA15-3 très élevées (5 à 10 fois la normale), suggèrent un stade avancé de la maladie, voire une maladie métastatique d'emblée. En moyenne 70,4% des patientes avec une évolution métastatique avaient des taux sériques élevés contre 29,6% dans les formes localisées. Cependant, 1 à 11% des sujets sains expriment la molécule (faux positifs) ([Mclaughlin R 2000](#)).

- La *mucin-like carcinoma-associated antigen* (MCA), CA 27-29, CA 549... sont utiles au suivi de la maladie métastatique, mais ils ne semblent pas offrir un avantage en termes de sensibilité ou de spécificité par rapport au CA15-3.

Les breast cancer antigens (BCA 225) sont des antigènes qui reconnaissent de façon similaire les MUC-1-glycoprotéines. Ce sont des marqueurs sensibles et spécifiques du cancer du sein ([Harada Y 2001](#) ; [Mathelin C 2006](#) ; [Ri G 2009](#)).

### **1.6.2 - Le Her2 ou ErbB2**

#### ***Structure et fonction***

Le gène HER-2/neu, membre de la famille des récepteurs EGF, a été découvert de façon indépendante dans quatre laboratoires différents, et donc il a des noms variés comme Her-2/neu ou C-erbB-2. Her-2/neu est une protéine surexprimée dans environ 25% à 30% des cancers du sein.

Le gène codant Her2 est situé sur le chromosome 17. Les récepteurs Her2 sont des récepteurs mono-transmembranaires, le domaine extracellulaire pour la reconnaissance et la liaison du ligand, le domaine transmembranaire nécessaire aux interactions avec d'autres récepteurs. Le

domaine cytoplasmique sert à l'auto-phosphorylation, nécessaire à l'interaction avec des protéines ([Schlessinger J 2000](#)).

Les études chez l'animal ont montré que quand un ligand pour EGF se lie à HER2 son domaine extra-cellulaire adopte une conformation dite ouverte qui permet la formation d'homo ou d'hétéro-dimère ([Burgess AW 2003](#)). Il n'y a pas alors de fixation de ligand et HER2 interagit rapidement avec un autre récepteur HER lié au ligand du fait que son domaine extra-cellulaire a constitutivement une conformation ouverte ([Garrett TP 2003](#)).

A la surface cellulaire, la dimérisation des domaines extra-cellulaires entraîne une interaction entre les kinases intra-cellulaires des récepteurs HER et une transphosphorylation des résidus tyrosine de l'extrémité C-terminale. Ces circuits de signalisation contrôlent l'expression des gènes cibles qui agissent de façon coordonnée pour modifier des aspects clés de la biologie cellulaire, la prolifération, la migration, la survie et la différenciation. En plus de ce mode principal, les récepteurs HER ou leurs fragments sont capables d'induire une signalisation directe.

Plusieurs études ont montré que HER2 entier peut être transporté vers le noyau et réguler directement l'expression du gène ([Wang SC 2004](#)). Le mécanisme de transport n'est pas complètement connu. D'autres voies de traduction alternative ont été décrites ([Anido JM 2006](#)).

Les malades avec cancer du sein exprimant un fragment nucléaire carboxyterminal (CTF) de HER2 ont plus de risque de développer des métastases ganglionnaires ([Molina MA 2002](#)) et ont un pronostic pire que ceux exprimant de façon prédominante le récepteur entier ([Saez R 2006](#)). De plus, la présence de CTF semble être importante pour le traitement du patient avec cancer du sein étant donné que 90 % des tumeurs exprimant CTF sont résistantes au traitement par le Trastuzumab ([Scaltriti M 2007](#)). Cependant, les CTF exprimés dans les tumeurs n'ont pas été caractérisés et on ne sait pas s'ils proviennent de la protéolyse ou d'une traduction alternative. De plus, étant donné que les activités de ces différents CTF n'ont pas été analysées, leur contribution individuelle comme phénotype malin n'est pas connue.

### ***Spécificité tumorale***

La surexpression de l'Her2 n'a pas été trouvée dans les tissus mammaires normaux ou des lésions bénignes, y compris les hyperplasies, mais il est fréquemment observé dans le carcinome canalaire in situ (CCIS), presque deux fois plus souvent que dans les cancers invasifs ([Kulka J 2006](#)).

Les cellules cancéreuses sont capables de produire des facteurs de croissance ainsi que d'accroître l'expression de leurs récepteurs. Parmi les récepteurs aux facteurs de croissance, ceux des peptides de la famille EGF qui ont été beaucoup étudiés du fait de leur relation avec la croissance tumorale. La famille EGF comprend les récepteurs EGFR, ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4 et les récepteurs cryptiques.

L'Her2 est surexprimé dans 20- 40% des cancers incluant le cancer du sein et conduit à une accélération du cancer (*Normanno N 2003 ; Press MF 1994*). Il constitue une cible thérapeutique par l'utilisation de l'anticorps monoclonal Trastuzumab. Cet anticorps pourrait inhiber la formation des dimères de récepteurs et leur signalisation (*Klapper LN 1997*), déréguler l'expression de Her2 et interrompre le cycle cellulaire (*Yakes FM 2002*).

La plupart des études montre que les tumeurs du sein surexprimant Her2 sont plus agressives et ont un plus mauvais pronostic. Ces tumeurs sont associées à la négativité des récepteurs ER et PR, à de forts taux de prolifération, à de l'aneuploïdie, à la surexpression de p53, à des lésions infiltrantes et à la résistance au traitement par Tamoxifène (*Ross JS 1998*).

### ***1.6.3 - La Mammaglobine***

#### ***Structure et fonction***

La mammaglobine est une protéine de 18-25 kDa appartenant à la famille des sécrétoglobines. Elle est codée par le gène SCGB2A2 (*Zafrakas M 2006 ; Carletti AM 2006*). A l'heure actuelle, aucune fonction physiologique n'a été associée à cette petite protéine dimérique sécrétée essentiellement par les tissus muqueux.

Les fonctions attribuées aux membres de la famille des sécrétoglobines sont variées et incluent l'immunosuppression par inhibition de la prolifération lymphocytaire et diminution de production d'IL-2 (*Maccioni M 2001*), l'induction de l'auto-immunité, une action anti-inflammatoire, un rôle comme cytokines dans une voie médiée par un récepteur encore inconnu et l'inhibition de la phospholipase A2, même si la spécificité de cette inhibition est débattue.

L'expression des sécrétoglobines a généralement été associée aux épithéliums sécrétoires dans le poumon, la prostate, les glandes mammaires, salivaires et sudoripares. Il n'y a que quelques études d'expression de sécrétoglobines dans les glandes endocrines et leurs résultats sont mitigés.



### ***Spécificité tumorale***

Depuis son identification en 1996 par Watson et Fleming, de nombreuses études ont démontré que la mammaglobine était exprimée essentiellement par le tissu mammaire et surexprimée (70-80%) dans les tumeurs du sein primaires et métastatiques ([Watson MA 1996](#) ; [Sasaki E 2007](#)). Bien que des études récentes aient démontré par RT-PCR que cette protéine était aussi surexprimée dans des tumeurs d'autres origines tissulaires (ovaire, prostate, poumon) ([Grunewald K 2002](#) ; [Sjodin A 2003](#)), il semblerait que la mammaglobine reste un marqueur très intéressant pour le cancer du sein ([Zehentner BK 2004a](#) ; [Zehentner BK 2004b](#)).

Elle pourrait être utile dans le diagnostic des épanchements malins et présenterait une forte spécificité et sensibilité ([Grunewald K 2002](#) ; [Fiegl M 2004](#) ; [Ciampa A 2004](#)).

La mammaglobine est un marqueur moléculaire hautement spécifique pour la détection de cellules tumorales circulantes dans le cancer du sein opérable ([Ntoulia M 2006](#)).

### ***1.6.4 - Les récepteurs hormonaux***

#### ***Structure et fonction***

Les récepteurs hormonaux sexuels sont des protéines faisant partie de la super-famille des récepteurs nucléaires, qui lient des hormones stéroïdes, thyroïdiennes et rétinoïdes. Les récepteurs pour les œstrogènes, ER alpha et ER beta, pour la progestérone, PR et pour les androgènes, AR, font partie de la première classe parmi les membres de la super-famille.

Les œstrogènes contrôlent la croissance et la différenciation des glandes mammaires, régulent l'expression des gènes dans les cellules du sein par le récepteur des œstrogènes (ER). ER est exprimé dans 70% des cas de cancer du sein, où la croissance des cellules cancéreuses est contrôlée par les œstrogènes et est souvent sensible au traitement par des inhibiteurs qui bloquent l'interaction entre l'œstrogène et le récepteur des œstrogènes.

Le récepteur des œstrogènes (ER) joue un rôle majeur dans la progression et le potentiel métastatique du cancer du sein chez les femmes. Les cancers du sein avec des cellules qui n'ont pas les ER sont généralement plus évolutifs et plus difficiles à traiter que ceux avec des cellules ER +. Les femmes avec ER négative ont un cancer plus avancé au moment du diagnostic que les femmes ER +.

Tandis que la progestérone a de multiples actions dans le processus de développement des seins et la différenciation, son rôle sur le cancer du sein est moins bien compris. Il a été montré que les progestatifs stimulent la migration des cellules cancéreuses du sein et l'invasion en raison de l'activation des cascades de signalisation conduisant à des

modifications du cytosquelette d'actine et de la membrane cellulaire qui sont requises pour le mouvement des cellules. La progestérone favorise la circulation des cellules cancéreuses du sein et de l'invasion en facilitant la formation de complexes de la Focal Adhesion Kinase (FAK) ([Fu XD 2010](#)).

### ***Spécificité tumorale***

Les femmes ER-, indépendamment de leur âge, sont plus susceptibles d'avoir des tumeurs de grade III ou IV et moins de grade I. L'expression d'ER dans les cellules du cancer du sein répond aux acides gras ([Alquobaili F 2010](#)).

Les facteurs de risque liés aux récepteurs des œstrogènes (ER) parmi les patients du cancer du sein dépendent généralement de l'âge.

La gravité du cancer du sein, est fonction du statut de ER et de PR de la tumeur ([Colditz GA 2004](#)).

Environ la moitié des cancers du sein métastatique, exprimant les récepteurs aux œstrogènes et/ou à la progestérone répond au traitement endocrinien et à l'hormonothérapie adjuvante postopératoires et entraîne environ 50% de réduction dans le développement d'une récurrence.

Le rôle des récepteurs d'œstrogène comme prédicteur de réponse au traitement endocrinien a été confirmé : un traitement endocrinien bénéfique est directement proportionnel au niveau des récepteurs des œstrogènes. La valeur pronostique des récepteurs de la progestérone n'a pas encore été validée comme facteur prédictif de l'efficacité du Tamoxifène.

Les tumeurs surexprimant Her-2/neu sont résistantes au traitement endocrinien et elles exigent le blocage de la voie Her-2/neu en plus de la privation d'œstrogènes ([Rastelli F 2008](#)).

### ***1.6.5 – Les antigènes de prédisposition héréditaire : BRCA1 et BRCA2***

Le BRCA1 et BRCA2 sont des gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN. Le gène BRCA1 a été découvert en 1994 sur le bras long du chromosome 17 ([Miki Y 1994](#)) et le gène BRCA2 en 1995 sur le chromosome 13 ([Wooster R 1994](#)). Il a été montré qu'environ 5% à 10% de tous les cancers du sein et 25% à 40% des cancers du sein familiaux survenant chez des femmes de moins de 35 ans sont attribuables à une cause héréditaire, 60% à 75% de ces cancers sont causés par une mutation des gènes BRCA1 ou BRCA2. ([Antoniou A 2003](#) ; [Uyei A 2006](#)). Les mutations de ces gènes

ont été trouvées dans des familles ayant un cancer du sein héréditaire et sont considérées comme un facteur prédisposant aux cancers de sein et des ovaires (*Nusbaum R 2007*).

Il existe plusieurs centaines de mutations connues dans ces gènes, dont beaucoup sont spécifiques de familles. Seules les modifications plus fréquentes ont été étudiées dans les associations entre un cancer du sein et des ovaires. Parmi les cas familiaux de cancers du sein associés au cancer de l'ovaire, plus de 80% ont des mutations BRCA1. Parmi les cancers familiaux, 52% ont des mutations BRCA1, 32% des mutations BRCA2 et 16% d'autres mutations (*Ford D 1998*).

Il est possible d'avoir à la fois des mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2, bien que cela soit très rare. Les mutations BRCA1 semblent être épistatiques à l'égard de la mutation BRCA2, ce qui signifie que les mutations BRCA1 masquent l'effet de la mutation BRCA2. En conséquence, une femme avec deux mutations a le même risque de cancer du sein qu'une femme avec juste une mutation de BRCA1.

Le cancer du sein progresse plus rapidement chez les femmes présentant des mutations BRCA1 et BRCA2 que chez les non porteuses. Des tumeurs et des carcinomes in situ ont également tendance à montrer plus de nécrose chez les porteuses que chez les non porteuses.

#### ***Autres mutations génétiques associées à un risque accru de cancer du sein :***

- Le gène suppresseur de tumeur p53 est un autre gène dont les mutations augmentent le risque de développer un cancer du sein.
- Deux mutations dans le gène ESR1 et une mutation dans le gène ESR2 sont associés à un risque accru de cancer du sein. Ces gènes concernent les voies des récepteurs d'oestrogène.
- Les gènes de l'ICAM (molécule d'adhésion intercellulaire) ont également été impliqués dans le risque accru de cancer du sein héréditaire et le cancer de la prostate.

Un nombre important de marqueurs moléculaires du cancer du sein a été étudié dans le but de déterminer leur capacité à prédire le pronostic, la réponse aux traitements, ou les deux.

D'autres marqueurs appartenant au groupe des kératines, le tissu polypeptide-spécifique antigène (TPS) constituent un reflet de l'activité proliférative des tumeurs mammaires. De plus, le dosage urinaire du facteur trilobé (PS2-TFF1) pourrait être utile dans le suivi des cancers du sein hormonodépendants (*Mathelin C 2006*).

La détection de cellules positives pour l'ARNm-cytokératine 19 avant le démarrage de la chimiothérapie adjuvante a montré que c'était un facteur pronostique indépendant de mauvais

résultat clinique chez les patients atteints d'un cancer du sein au stade précoce (*Ignatiadis M 2007 ; Ignatiadis M 2008 ; Xenidis N 2006*). La cytokératine 19 est apparue comme très sensible pour détecter tous les cancers du sein, tandis que BU101, BS106 et Mammaglobine étaient moins utiles (*Brown NM 2006*).

Actuellement, de nouveaux marqueurs apparaissent surexprimés dans le cancer du sein, CLDN1 et surtout CLDN4 dont l'expression élevée est associée à un mauvais pronostic et un grade tumoral élevé dans le cancer du sein (*Lanigan F 2009*).

L'Ep-CAM (CD326) qui joue un rôle dans l'adhésion cellulaire et la prolifération est surexprimé dans les carcinomes primitifs du sein. Les données cliniques et précliniques suggèrent un rôle pour l'Ep-CAM en cas de métastases.

Nous avons parlé de ces marqueurs plus en détails dans le chapitre II de cette thèse.

Par ailleurs, d'autres catégories de marqueurs ont montré une utilité clinique et ont été recommandés pour l'utilisation dans la pratique : Human epidermal growth factor receptor 2, urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1. Par contre, les marqueurs suivants ont démontré des résultats insuffisants pour une utilisation en routine dans la pratique clinique : DNA / ploïdie par cytométrie en flux, p53, la cathepsine D, cycline E (*Harris L 2007 ; Hernández L 2005*).

# **Troisième partie :**

## **Les techniques utilisées**

## **I – La détection des cellules tumorales dans les épanchements malins**

### **I.1- La cytologie conventionnelle**

Le développement des métastases est le mode ultime d'extension ou de récurrence du cancer. La découverte de métastases a une valeur pronostique de gravité et rend le traitement local (exérèse chirurgicale) inefficace. Il serait très intéressant de pouvoir détecter des cellules détachées et en suspension dans les liquides biologiques pour évaluer le potentiel métastatique des tumeurs diagnostiquées et anticiper leur développement.

Ces liquides biologiques sont facilement accessibles à l'analyse par ponction mais les cellules tumorales y sont rares et mélangées à d'autres cellules normales ou inflammatoires (leucocytes ou cellules épithéliales). Deux problèmes se posent alors :

- Détecter des cellules épithéliales.
- Identifier leur caractère tumoral et leur origine tissulaire

#### ***I.1.1 - La cytologie des cellules isolées (immunocytochimie)***

Cette technique de référence permet une étude en microscopie optique des cellules étalées sur lames. Les cellules suspectes ou franchement malignes sont identifiées par leur morphologie après coloration (par exemple Papanicolaou ou May Grünwald Giemsa), mais les cellules sont fragiles et il est indispensable de les fixer pour éviter la cytolyse (figure 9).

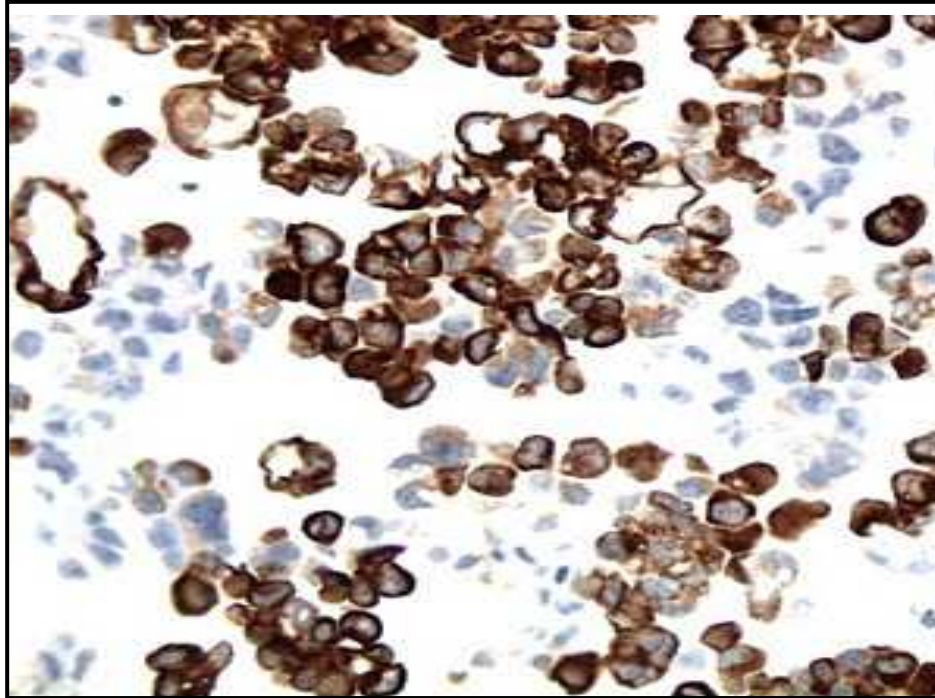
Cependant, la morphologie n'est pas toujours suffisante pour identifier les cellules et peut bénéficier de marquages moléculaires par des anticorps (immuno-cytochimie). La HBME-1, la thrombomoduline, la Calrétinine, le MOC-31, le Ber-EP4, l'E-cadhérine, l'ACE et le CA19-9 peuvent être utilisés dans la cytologie des épanchements séreux et utiles dans la distinction entre les adénocarcinomes et une prolifération métastatique mésothéliale. Il y a aussi les anticorps EMA, CA125 qui sont utilisés en cytologie ([Lozano MD 2001 ; Ueda J 2006](#)).

L'immuno-cytochimie (ICC) a permis de développer des techniques plus sensibles et partiellement automatisables d'analyses de cellules en suspension. Les liquides sont fixés, centrifugés et le culot est étalé sur lame. Lorsqu'ils sont très riches, une inclusion du culot en paraffine est possible.

Les ponctions d'organes pleins sont immédiatement étalées sur lame et fixées ou séchées à l'air en fonction de la coloration choisie. Toute incertitude cytologique souvent défini comme

"cellules suspectes de malignité" ou "présence de cellules atypiques" doit conduire à un prélèvement biopsique pour confirmer le diagnostic.

Cette technique manuelle est longue, laborieuse et nécessite des compétences très spécifiques.



**Figure 9 :** Expression de l'antigène MUC-4 dans les cellules isolées d'effusion péritonéale de cancer de l'ovaire

#### ***1.1.2- La cytologie des cellules tissulaires (immunohistochimie)***

L'immunohistochimie peut être pratiquée sur des étalements cytologiques. La technique est cependant plus délicate et ne peut pas être répétitive comme sur les coupes histologiques en paraffine.

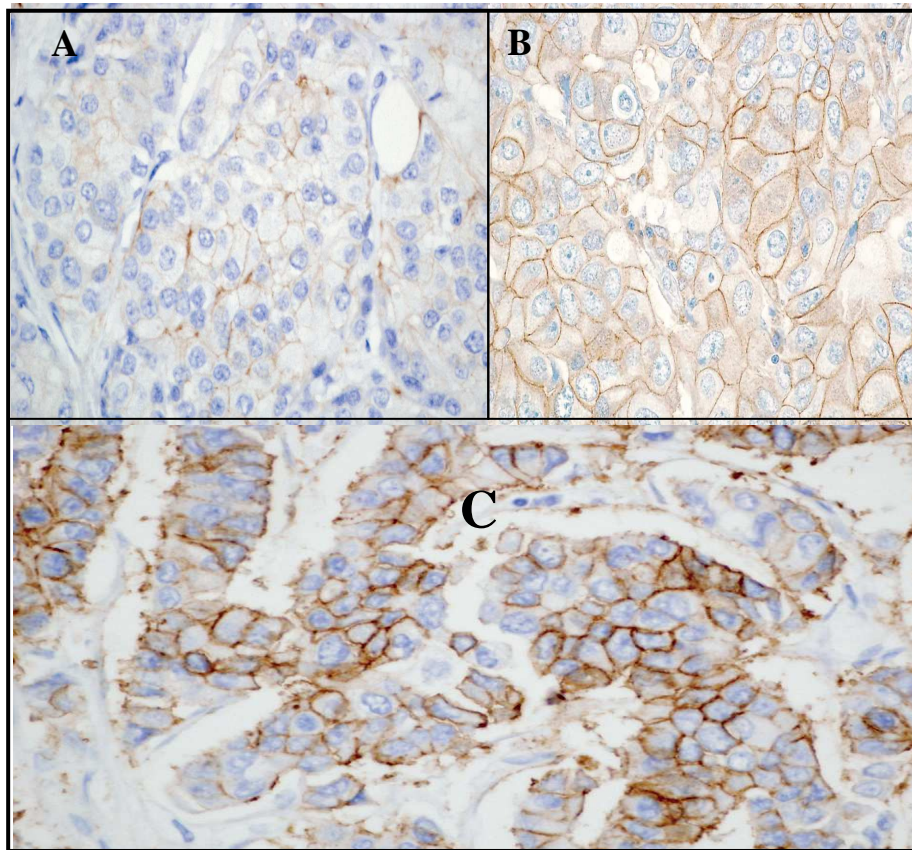
L'examen immuno-histochimique (IHC) consiste à révéler sur coupe histologique, par réaction antigène-anticorps, la présence d'antigènes cellulaires intranucléaires, membranaires ou cytoplasmiques. Il a été adapté à la mise en évidence des protéines sur des coupes tissulaires. Il garde son intérêt grâce aux informations qu'il apporte sur la morphologie cellulaire et la localisation des protéines dans les compartiments intra-cellulaires et dans différents types cellulaires visualisés sur la coupe. L'IHC est donc utilisée en recherche fondamentale pour comprendre la distribution et la localisation de biomarqueurs et de protéines exprimés dans les différentes parties d'un tissu.

L'anticorps CB11 a été appliqué pour détecter l'expression de l'oncoprotéine HER-2/neu.



L'immunohistochimie est considérée comme une technique semi-quantitative, qui permet des comparaisons du niveau d'expression protéique entre les types cellulaires et les contrôles. Pour cela des scores de quantification sont proposés qui prennent en compte le pourcentage de cellules marquées ([Harvey JM 1999](#)). Les essais de standardisation de cette méthode sont très difficiles et opérateur-dépendant.

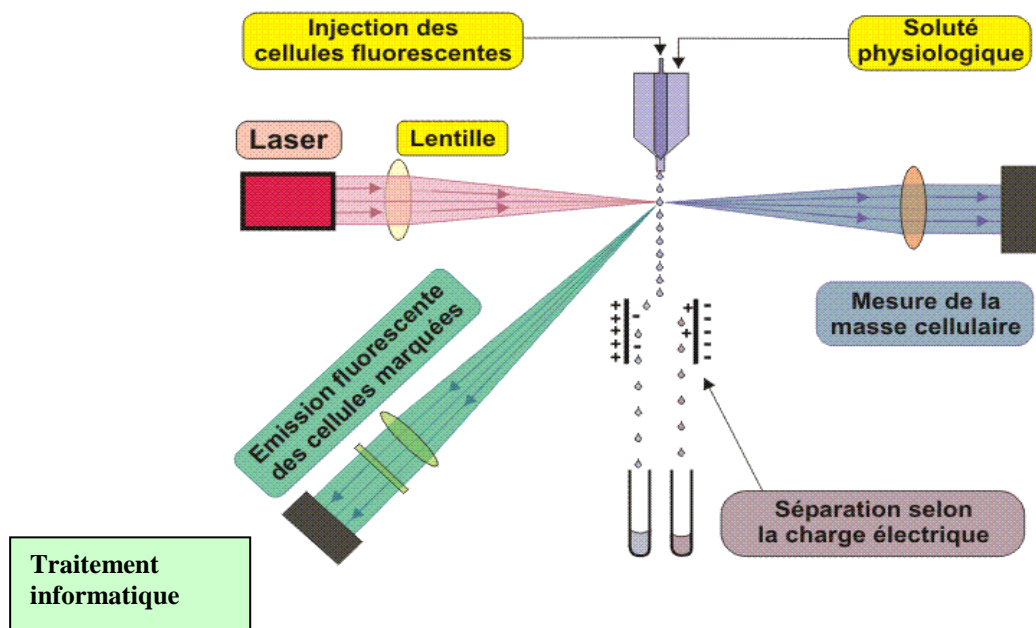
L'immunohistochimie (IHC) est une technique largement utilisée pour le diagnostic et/ou le suivi de cancer par détection de cellules anormales telles que celles trouvées dans les tumeurs cancéreuses.



**Figure 10 :** Aspect des cellules malignes tissulaires (Her-2/neu A (Score 1+); B (Score 2+); C (Score 3+) dans le carcinome mammaire par immunohistochimie) D'après : [Kulka J, Pathology Oncology Research 2006](#)



## I.2- La cytométrie en flux



**Figure 11 :** Schéma du principe de la cytométrie de flux

La cytométrie en flux (CMF) est une méthode d'analyse cellulaire par cellule, à grande vitesse, dans un flux liquide (Figure 11). Plusieurs paramètres peuvent être analysés simultanément : taille, structure et de nombreux immuno-marquages en utilisant des anticorps couplés à des fluorochromes différents. La CMF est quantitative sur une échelle de 5 logs, rapide (100 – 10000 cellules/sec) et extrêmement sensible. Les antigènes membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires peuvent être analysés. L'étude peut être faite sur cellules vivantes, fixées et/ou perméabilisées.

Elle peut avoir deux types d'application pour la détection des cellules tumorales. D'une part, il est possible d'analyser le contenu en ADN sachant que les cellules cancéreuses présentent des anomalies du cycle cellulaire et chromosomique somatiques (diploïdie, hétéropléidie) ([Saha I 2000](#)). Les cellules tumorales peuvent être caractérisées par immunophénotypage spécifique de marqueurs tumoraux ([Rijken A 1991](#)).

La cytométrie en flux est une technique performante pour la caractérisation des cellules cancéreuses dans les épanchements pour le diagnostic et la recherche. Elle est comparable à l'immunohistochimie en terme de sensibilité et de spécificité, avec l'avantage supplémentaire de fournir des données quantitatives ([Dong HP 2007](#)). La cytométrie est un outil puissant pour diagnostiquer des épanchements difficiles et pour mesurer la co-expression de divers

marqueurs dans les échantillons frais. En employant les marqueurs cellulaires adaptés associés aux marqueurs biologiques, la CMF est également très prometteuse pour des études expérimentales (*Davidson B 2002*).

L'immunophénotypage par cytométrie en flux est bien admis comme une technique auxiliaire dans le diagnostic des hémopathies malignes (*Moriarty AT 1993*).

En monomarquage, il semblerait que les anticorps dirigés contre le MUC1 et l'Ep-CAM permettent la détection des cellules épithéliales tumorales dans les épanchements malins (*Czerniak B 1985 ; Risberg B 2000 ; Davidson B 2002*). Le Ber-EP4 est également un marqueur pour détecter les cellules épithéliales. Des doubles marquages CD45/ Ber-EP4, N-cadherin/Ber-EP4 permettent l'identification de cellules épithéliales malignes dans des liquides pleuraux et péritonéaux avec une sensibilité et une spécificité très intéressantes (*Risberg B, 2000 ; Davidson B, 2002*). L'utilisation de marquages multiples présente aussi l'avantage d'orienter vers une origine tissulaire. Ainsi, la détection des épanchements malins d'origine ovarienne est possible avec un marquage multiparamétrique (*Sigstad E 2005 ; Davidson B 2003*).

Nous souhaitons mettre au point une méthode quantitative, multiparamétrique de caractérisation de cellules tumorales (adénocarcinomes) minoritaires, en suspension dans une population complexe. Les cellules d'intérêt sont marquées par des anticorps spécifiques de marqueurs tumoraux. Dans un premier temps, de 4 à 6 marquages pourront être utilisés simultanément. Comme il n'existe pas pour l'instant de marquages spécifiques, la combinaison de marqueurs de différentes natures sera nécessaire.

### **I.3 - La biologie moléculaire**

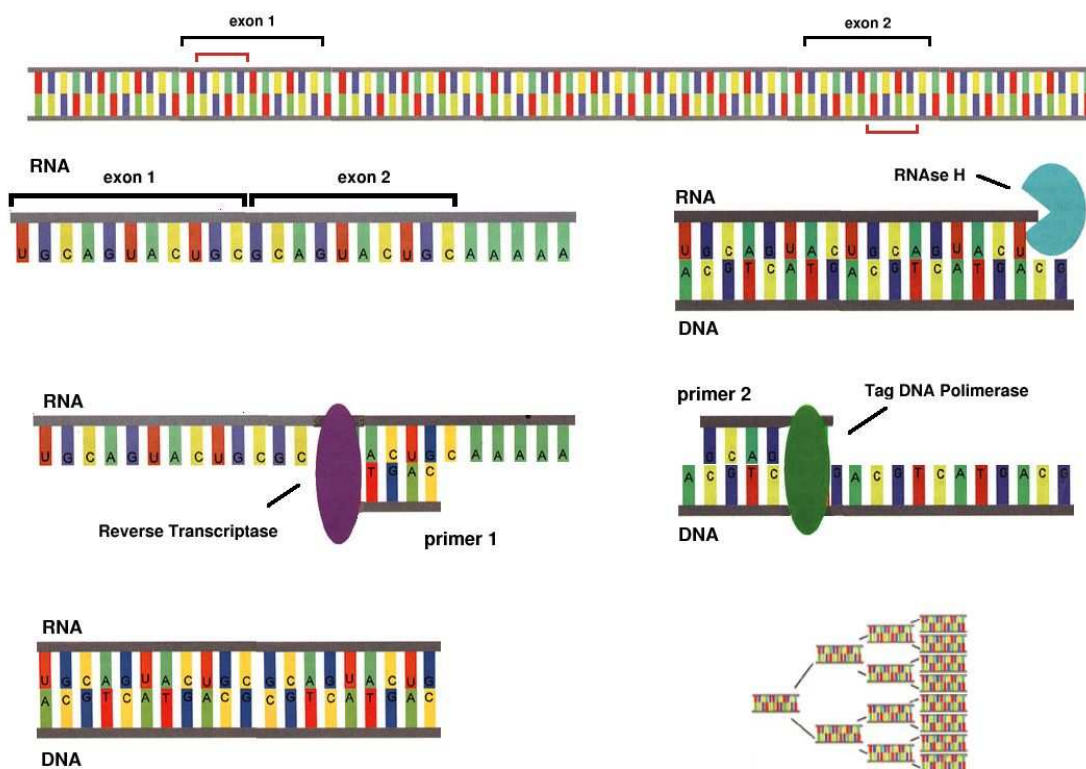
La réaction de polymérase en chaîne (PCR), permet d'étudier avec une sensibilité extrême et une grande précision l'expression des gènes de régulation de la prolifération et de l'apoptose cellulaire (*EL-Habashi A 1995 ; Liebermann DA 1995*). Les nouvelles techniques de PCR quantitatives permettent de mesurer le niveau d'expression de ces transcrits et d'identifier des cellules malignes au sein des effusions (*Lloyd JM 2006 ; Nakanishi H 2000 ; Koder Y 2005 ; Ito S 2005 ; Schmidt P 2001 ; Tamura N 2007 ; Wang JY 2005 ; McLemore MR 2005 ; Passebosc K 2005 ; Li G 2003*). Ainsi, l'expression de certains marqueurs tels que CK19 (*Xu F 2004*), Ep-CAM (*Nagel H 2003*) et les mucines (*Yu CJ 2001*) présentent une sensibilité et une spécificité plus importantes par cette technique que celle obtenue avec la cytologie.

Cette méthode permet d'amplifier in vitro une partie spécifique d'un acide nucléique donné (ADN ou ARN) afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter.

### *1.3.1- La technique de PCR en temps réel*

La RT-PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique découverte par Kary Mullis en 1986 et qui lui valu le prix Nobel de chimie en 1993.

La RT-PCR en temps réel couple une RT-PCR classique à une méthode de quantification de fluorescence utilisant des sondes ou le cyber green (*Higuchi R 1993*). La cinétique de quantification est basée sur la détection « en temps réel » du signal fluorescent dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de produit PCR généré au cours de l'amplification. La quantification du signal repose sur le concept de « threshold cycle » (Ct) où le Ct correspond au plus petit nombre de cycles pour lequel l'intensité du signal fluorescent est supérieure au bruit de fond (*Gibson UE 1996*).



**Figure 12 :** Schéma de la réaction de RT-PCR

La RT-PCR est une méthode ciblée, s'adressant à un nombre limité de gènes préalablement sélectionnés. Ainsi, l'intérêt de cette technologie répond plus à une volonté d'évaluation précise de la valeur diagnostique et/ou pronostique de marqueurs moléculaires impliqués dans

un contexte donné. La sélection des gènes d'intérêt est effectuée en fonction de la problématique étudiée, les amorces et les sondes d'intérêt sont choisies à partir de la séquence du cDNA de chaque gène provenant de l'analyse des bases de données de la littérature (SAGE, transcriptome, ...). Dans cette sélection, plusieurs gènes de référence servant de gènes contrôle de la qualité et de la quantité des ARN étudiés sont systématiquement inclus.

La PCR en temps réel est une technique très rapide apparue comme un outil indispensable en biologie moléculaire. Elle est largement utilisée pour la quantification de l'expression des gènes, mais la standardisation de cette technique demeure partielle. Les difficultés sont multiples : les variations dans la récupération des acides nucléiques, la dégradation de l'ARN dans l'échantillon, les cinétiques d'amplification différentes selon les gènes. De plus, des spécificités liées aux échantillons biologiques sont capables d'affecter la cinétique de la PCR et la fiabilité de la quantification de l'expression. Ces variations pourraient facilement être interprétées à tort comme des variations d'expression génique, notamment dans le cas des gènes faiblement exprimés ou de discrètes différences d'expression.

### ***1.3.2 – Le principe de la quantification par PCR en temps réel :***

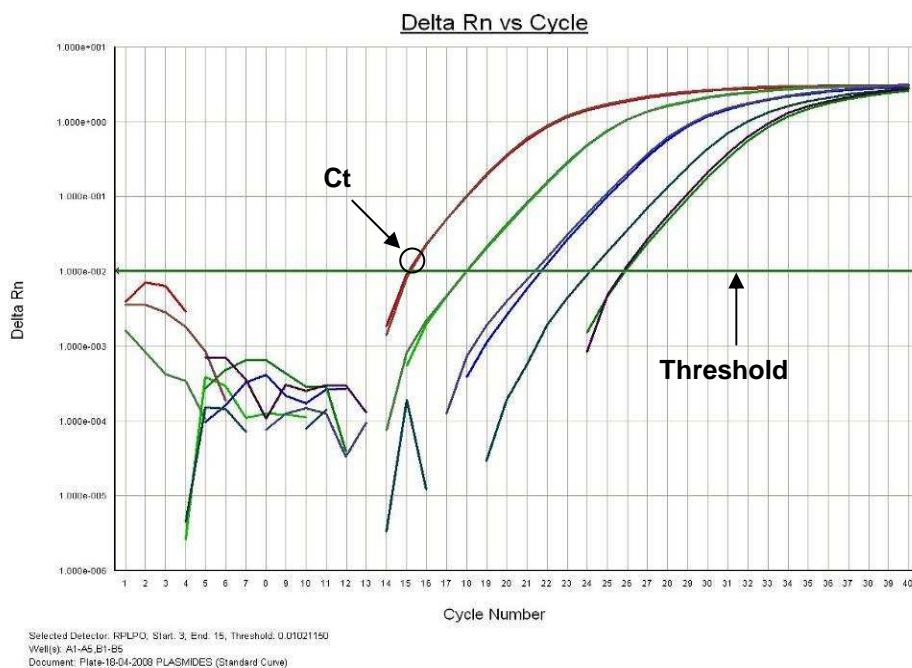
La RT-PCR est une technique très intéressante dans l'identification de cellules malignes et permet d'étudier l'expression des gènes avec une sensibilité extrême et une grande précision.

La PCR quantitative en temps réel est une technique reproductible, performante et beaucoup plus sensible que la PCR classique. Elle nécessite une faible quantité d'échantillon et a l'avantage de ne pas dépendre de la disponibilité et de la variabilité d'un anticorps comme c'est le cas dans les techniques d'immunomarquage. De nombreuses études montrent que cette technique peut être utilisée en routine pour le diagnostic et le suivi thérapeutique de pathologies malignes ([Bustin SA 2005](#)).

La technique de PCR en temps réel réalise une amplification exponentielle et sélective de séquences d'ADN cible et permet de mesurer par fluorescence l'accumulation des produits d'amplification au cours de la réaction de PCR. Durant les premiers cycles de la PCR, la fluorescence reste à son niveau de base. Le seuil de détection correspond à une intensité de fluorescence significativement plus élevée que le niveau de base. Le cycle à partir duquel la courbe de fluorescence dépasse le niveau du bruit de fond correspond au seuil de détection ou

cycle seuil Ct (Cycle threshold) (figure 13). Le cycle seuil est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible présent dans l'échantillon avant la PCR. Un Ct précoce correspond à un échantillon contenant beaucoup d'ADN cible. La comparaison du Ct obtenu avec un échantillon en comparaison avec le Ct obtenu avec des échantillons contenant des quantités connues permet de réaliser une courbe standard et d'extrapoler la quantité d'ADN ou d'ARN cible présente dans l'échantillon de départ.

La qualité de l'ARNm extrait du prélèvement est validée par l'analyse de gènes exprimés de façon ubiquitaire (gènes domestiques) avec un niveau d'expression comparable dans toutes les cellules, tels que la  $\beta$ -actine ou la phospho-protéine ribosomale acide Po (RPLPO) (*Dheda K 2004*). Le gène de ménage que nous utiliserons, sera le RPLPO. La quantité relative d'ADNc spécifique est généralement rapportée à la quantité d'ADNc d'un de ces gènes domestiques.



**Figure 13 :** Le niveau du bruit de fond correspond au seuil de détection ou cycle seuil Ct (Cycle threshold)

Nous voulons développer dans notre travail la quantification absolue en utilisant des plasmides de référence pour chaque gène étudié. Nous pourrions alors déterminer un nombre précis de copies pour chaque transcript dans un échantillon donné. Selon les résultats obtenus, certains marqueurs seront mis de côté tandis que d'autres pourront être inclus dans cette étude.

### ***I.3.3 - Les types de quantification par PCR en temps réel***

La quantification des acides nucléiques peut se faire soit de façon « absolue » après établissement d'un étalonnage, soit de façon relative par rapport à un gène de référence.

Deux approches de quantification par PCR en temps réel existent :

- 1- *PCR quantitative absolue* : La quantification absolue utilise des standards externes de concentration connue pour générer une courbe standard qui sert à calculer les valeurs d'expression pour les échantillons.

Quantification absolue par étalonnage avec un standard : les cinétiques sont mesurées pour différentes concentrations du gène ou transcrit cible. On en déduit une courbe du Ct en fonction de la quantité d'acides nucléiques et une mesure du coefficient d'efficacité E. La courbe d'étalonnage ainsi constituée permet de déduire la concentration à partir d'une mesure du Ct. La principale difficulté réside dans la capacité à titrer avec précision et reproductibilité les solutions d'étalonnage.

- 2- *PCR quantitative relative* : la quantification relative utilise deux alternatives :
  - sans calibrateur : par calcul du rapport entre le niveau d'expression du gène cible et celui d'un gène de ménage, les deux déterminés sur la base des courbes standard avec des valeurs théoriques ou bien par la différence entre les Ct du gène cible et celui du gène de ménage (méthode delta Ct) avec la formule

$$N = 2^{(Ct \text{ target} - Ct \text{ housekeeping}) \text{ sample}}$$

- avec calibrateur: par calcul du rapport entre l'expression du gène cible/gène de ménage après normalisation avec le rapport de l'expression du gène cible/gène de ménage d'un échantillon calibrateur (méthode delta delta Ct) avec la formule

$$N = 2^{(Ct \text{ target} - Ct \text{ housekeeping}) \text{ sample} / (Ct \text{ target} - Ct \text{ housekeeping}) \text{ calibrateur}}$$

Quantification relative : un gène de référence est quantifié en même temps que le gène étudié, la concentration de ce dernier étant ensuite normalisée par rapport à celle connue du gène de référence.

La production du produit de PCR est mesurée en temps réel, la quantité de fluorescence suit une cinétique exponentielle avec un aspect sigmoïde en représentation semi-logarithmique, la partie stable initiale correspond au bruit de fond et le plateau final à la consommation des

réactifs. Il existe un consensus pour mesurer la quantité de fluorescence au début de la partie linéaire de la courbe, cette manière assurant la plus forte reproductibilité. L'intersection de la courbe d'amplification exponentielle avec un seuil mis au début de la partie linéaire permet d'attribuer à chaque réaction PCR une valeur appelée cycle seuil Ct (threshold cycle). Le principe de la quantification par PCR en temps réel est basé sur des calculs intégrant cette valeur cycle seuil Ct qui est en relation logarithmique avec la quantité d'ADN de départ.

#### ***1.3.4 – Les applications de la RT-PCR en temps réel***

L'analyse des données de la littérature montre qu'un grand nombre de groupes utilisent cette approche quantitative pour déterminer le niveau d'expression des gènes dans des conditions physiologiques ou pathologiques données. De même, certaines études transcriptionnelles complètent et confirment les résultats obtenus par puces à ADN pour certains gènes par une approche de RT-PCR en temps réel.

#### ***L'analyse quantitative de l'expression des marqueurs tumoraux dans des échantillons sériques :***

Dans le domaine de la pathologie carcinomateuse, de nombreuses études se sont attachées à isoler des marqueurs tumoraux diagnostiques et/ou pronostiques dans les tissus mais également dans des liquides biologiques variés: liquide de kystes, urines, sang total ou sérums. Plusieurs types de marqueurs ont été évalués : des protéines, la présence de cellules circulantes, ou plus récemment des molécules d'ADN ou d'ARN extracellulaires circulants provenant de cellules tumorales ([Guadagni F 2001](#) ; [Silva JM 1999](#) ; [Wieczorek AJ 1985](#)). La mise en évidence d'ARN dérivés de tumeurs dans les sérums de patients atteints de cancer ouvre de nouvelles perspectives diagnostiques ([Kopreski MS 1999](#)). Parmi eux, l'ARN de la composante catalytique de la télomérase est un des marqueurs les plus prometteurs puisqu'il est exprimé précocément et quasi-exclusivement dans les cellules tumorales malignes, quel que soit leur type. Ainsi, la faisabilité du dosage de l'ARNm de la composante catalytique de la télomérase (hTERT) dans le diagnostic des cancers a été démontrée dans plusieurs études ([Chen XQ 2000](#) ; [Liedo SM 2004](#)). Cette approche mérite certainement d'être approfondie en développant des combinaisons de marqueurs qui permettraient théoriquement d'accroître la sensibilité et la spécificité d'un test sérique et même d'améliorer sa performance diagnostique. En conclusion, la technique de RT-PCR en temps réel est une alternative intéressante aux techniques de microarray. La faible quantité de matériel biologique nécessaire et

l'automatisation de cette technique permettent la quantification simultanée d'un grand nombre de gènes. Utilisée en première intention, la RT-PCR en temps réel s'est montrée à la fois utile pour le diagnostic mais aussi pour la découverte de nouveaux gènes impliqués dans la physiopathogénie de différentes lésions.

### ***I.3.5 - Les autres techniques de biologie moléculaire***

#### ***I.3.5.1 – Le profil génomique par utilisation de puces à ADN***

Les puces à ADN sont basées sur une technologie multiplex. Elle consiste à étaler une série de milliers de spots d'oligonucléotides de DNA appelées traits chacun contenant des picomoles de séquence d'ADN spécifique. Ce peut être une séquence courte de gènes ou d'autres éléments de DNA qui sont utilisés pour hybrider un échantillon de cDNA ou de cRNA (appelé cible) sous conditions hautement stringentes. Les puces à ADN peuvent être utilisées pour mesurer des variations dans les niveaux d'expression ainsi que pour détecter des SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Les microarrays diffèrent dans la fabrication, l'exploitation, la précision, l'efficacité et le coût. Des facteurs additionnels pour l'utilisation des microarrays sont la conception expérimentale et les méthodes d'analyses de données.

#### **Exemples :**

- *La technologie affymetrix* utilise la photolithographie et la chimie des phases solides pour produire des biopuces contenant des centaines de milliers de sondes d'oligonucléotides compactés à des densités extrêmes. Les sondes sont conçues de manière à maximaliser leur sensibilité, leur spécificité ainsi que leur reproductibilité, permettant ainsi de faire la différence entre le "bruit de fond" et les signaux d'intérêts, ainsi qu'entre deux séquences cibles de structure très proche.

Le principe de la technique affymetrix repose sur l'existence de séquences dites consensus qui servent de références et doivent être spécifiques d'un gène donné. Ces puces peuvent contenir jusqu'à 1,6 million de spots. Chacune est composée d'un grand nombre d'oligonucléotides de 25 bases identiques qui sont synthétisés sur la puce.

- D'autres équipements existent et notamment les *plate-formes ILLUMINA*. L'analyse du transcriptome du cancer a permis de caractériser le profil d'expression génique associé au cancer et d'identifier des gènes spécifiquement surexprimés par les cellules néoplasiques. Ces gènes sont des marqueurs candidats potentiels pour le diagnostic, le pronostic et le développement de thérapies ciblées du cancer.



L'analyse du transcriptome des tumeurs, principalement par la technique de puces à ADN, a permis d'identifier des profils d'expression génique spécifiques de certains types tumoraux et de mettre en évidence des associations entre des profils d'expression et des données cliniques ([Bertucci F 2002](#)).

Les niveaux d'expression des gènes reflétés par une puce est une donnée absolue qui n'est pas directement informative. C'est la comparaison entre puces qui fournit une donnée relative : le rapport des niveaux observés entre une condition témoin (ou référence) et une condition test est exploitable. Pour chaque gène, c'est le rapport entre ses niveaux d'expression mesurés dans des conditions différentes qui est informatif

#### *1.3.5.2 - La technique de séquençage à haut débit*

Le profil d'expression de gènes dans un tissu ou des cellules en culture est souvent un point de départ pour des études de génomique exploratoire. Une analyse en série de l'expression génique (SAGE) ([Velculescu VE, 1995](#)). C'est une technologie pour les études d'expression du gène qui peut offrir une couverture du transcriptome entier, mais elle est lente et relativement à haute intensité parce que chaque clone qui est généré pendant la construction de la bibliothèque doit être séquençé. L'invention de la technologie des puces à ADN ([Pease AC 1994 ; Schena M 1996](#)), en combinaison avec des informations sur les séquences pour le génome humain, a la possibilité d'évaluer rapidement le profil du transcriptome d'un échantillon d'ARN. Une technique récemment développée et la signature dite massivement parallèle, le séquençage (SSPM) ([Brenner S, 2000](#)), permet le transcriptome d'un échantillon d'ARN à déterminer, sans connaissance préalable du génome de l'organisme à étudier. Un avantage est que la SSPM a plus de puces à ADN et que l'expression des gènes inconnus peut être observée à partir de la séquence spécifique de sondes d'acide nucléique sont nécessaires pour la détection.

La SSPM s'apparente à la SAGE en ce qu'elle utilise des sondes de courtes séquences pour identifier les transcriptions, cependant, les techniques diffèrent quant à la méthode utilisée pour la détermination des séquences. En SSPM, le séquençage de l'intégralité de la bibliothèque se produit en parallèle sur des microbilles par des cycles multiples de clivage enzymatique suivie d'une ligature des adaptateurs étiquetés de manière à identifier la séquence révélée par le clivage enzymatique; par opposition à l'ADN de terminaison de la chaîne de séquençage de clones individuels dans SAGE. SSPM a été utilisé pour profiler l'expression génique des lignées de cellules animales ([Jongeneel CV 2003](#)).

#### *1.3.5.3 – La technologie SEREX*

Cette technique consiste en un clonage d'expression (SEREX) pour détecter des antigènes de tumeurs humaines. L'analyse sérologique des antigènes par clonage d'expression recombinant (SEREX) a été utilisée par de nombreux laboratoires par immunoscreen de banques de phages  $\lambda$  d'ADNc produites à partir d'une gamme de types de cellules tumorales.

Le SEREX est une technique visant à isoler les antigènes tumoraux qui ont entraîné des réponses de haut titre d'IgG chez les malades. C'est une méthode d'immunocriblage par le clonage de gènes, avec deux traits essentiels qui la distinguent de « l'immunoscreening » utilisé pour identifier les cibles, par exemple dans les maladies auto-immunes ([Sikaroodi M 2010](#)).

#### *1.3.5.4 – La Protéomics*

La Protéomics est l'étude des protéines à large échelle et particulièrement de leur structure et de leur fonction. Les protéines sont des molécules essentielles des organismes vivants comme elles sont le composant principal des voies métaboliques et physiologiques des cellules. Le terme protéomics a été utilisé pour la première fois en 1997 pour établir une analogie avec génomics qui est l'étude des gènes. Le terme protéome est le mélange de protéines et de génomes. Le protéome est l'ensemble des protéines incluant les modifications réalisées à un ensemble de protéines produites par un organisme ou un système. Cela variera avec le temps et les besoins distincts ou les tensions présentées par une cellule ou un organisme. Pour étudier le protéome, la spectrométrie de masse MS ou MS/MS MALDITOF peut être utilisée.

#### *1.3.5.5 – La Glycomics*

C'est un terme analogue à proteomics qui est l'étude des glycomes (l'association de sucres à la fois libres ou présents dans des molécules plus complexes de l'organisme), incluant des aspects génétiques, physiologiques, pathologiques et autres ([Kiyoko 2008](#) ; [Srivastava S 2008](#)). En effet, de nombreuses modifications post-traductionnelles ont permis de mettre en évidence un certain nombre d'antigènes de tumeur dont l'unique modification consiste dans l'altération de son profil de glycosylation.

## II – La détection des marqueurs tumoraux dans le sang périphérique

### II.1 – Les cellules cancéreuses circulantes

Les métastases sont la principale cause de décès chez les patients présentant des tumeurs malignes solides épithéliales, comme le sein, le cancer colorectal et le carcinome de la prostate. Certaines études suggèrent que la découverte de métastases, à un stade très précoce où le cancer est considéré comme strictement localisé, permettrait de débiter très rapidement un traitement adapté et améliorerait la survie. Par conséquent, comme démontré dans des études récentes, la détection de cellules tumorales disséminées dans le sang périphérique pourrait avoir des conséquences cliniques par rapport au pronostic de chaque patient et de la tenue ou la surveillance du traitement. Cependant, la rareté des cellules tumorales disséminées dans le sang périphérique rend l'application de techniques sensibles obligatoires pour leur détection ([Zieglschmid V 2005](#)). Depuis quelques années, le développement de techniques sensibles d'amplification génique (RT-PCR) a permis d'objectiver la présence de cellules tumorales circulantes chez des patients dont les critères de stadification initiaux avaient classé leur tumeur comme cliniquement localisée ([Raj GV 1998](#) ; [Xenidis N 2006](#) ; [Allan AL 2010](#)). La RT-PCR, combinant une étape pré analytique d'enrichissement avec l'évaluation de marqueurs moléculaires de tumeurs exprimés dans les cellules tumorales disséminées, fournit un outil puissant dans la détection des cellules tumorales disséminées avec une grande sensibilité et spécificité. La détection de cellules tumorales disséminées dans le sang périphérique des patients atteints de cancer par RT-PCR peut également être une méthode intéressante pour la sélection des patients en vue d'un traitement adjuvant.

La circulation des cellules cancéreuses dans le sang joue un rôle central dans le processus métastatique. Leur nombre peut être très petit et les techniques de détection doivent être à la fois sensibles et spécifiques. La Polymérase Chain réaction (PCR) a été utilisée pour détecter un petit nombre de cellules tumorales dans les cancers hématologiques dont les anomalies de l'ADN sont suffisamment homogènes ([Chan K C A 2007](#)). Les marqueurs tumoraux ont été développés afin de détecter des affections malignes précoces.

Des études ont utilisé l'ARNm comme marqueur des cellules tumorales dans le sang périphérique chez des patients présentant des métastases à distance.

Plusieurs articles ont démontré que l'ARN messenger était dégradé en quelques secondes dans le plasma et le sérum. L'existence de l'ARN circulant est une découverte remarquable parce que l'ARN est plus instable que l'ADN à cause de la ribonucléase qui est présente dans le plasma (*Tsui NB 2002 ; Hasselmann DO 2001 ; Ng EK 2002*). La stabilité de la molécule d'ARN circulant a été étudiée chez les sujets normaux et il a été montré que la stabilité de l'ARN est due à son association sous forme de complexe avec des lipides, des protéines, des lipoprotéines, ou des phospholipides dans le plasma, ce qui pourrait le protéger de la dégradation par la ribonucléase (*Ng EK 2002*).

L'ARNm transcrit dans les cellules cancéreuses peut être détecté dans le sang, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques par RT-PCR dans les différents types de cancer.

Les marqueurs ARNm communément évalués comprennent les cytokératines 18 et 19, mucine épithéliale (MUC1), l'antigène carcinoembryonnaire (ACE), la MGB, le CD44 et la Maspine (*Silva JM 2001*).

## **II.2 - La localisation et le transport intracellulaire de l'ARNm dans les cellules**

La localisation de l'ARNm est utilisée par différents types de cellules polarisées pour exprimer localement des protéines spécifiques et ainsi restreindre leur distribution à une région particulière du cytoplasme. Ce mécanisme offre la possibilité de réguler localement l'expression de ces protéines. Le transport et la localisation d'ARNm spécifiques jouent un rôle important lors du développement des organismes multicellulaires, ainsi que dans des processus biologiques tels que la transmission synaptique, la mobilité cellulaire et la division cellulaire asymétrique (*Cole CN 2006*).

## **II.3 - Les caractéristiques et l'origine biologique de l'ARNm circulant**

Bien qu'il n'existe pas d'étude sur l'origine de l'ARN circulant, il est logique de penser qu'il vient des cellules circulantes. Cependant, il est difficile de déterminer si la différence de profils d'expression génique entre les patients atteints de cancer et les sujets normaux est la réponse des cellules sanguines dans un contexte pathologique ou est le reflet direct de l'expression des gènes des cellules cancéreuses.

La mort cellulaire, en particulier par apoptose, est peut-être le mécanisme responsable de la libération des acides nucléiques dans le plasma (*Jahr S 2001*). En effet, l'apoptose des cellules

pourrait libérer les acides nucléiques des corps apoptotiques (*Halicka HD 2000*). Une partie de l'ARN circulant pourrait provenir de cellules apoptotiques présentes dans le plasma. (*Hasselmann DO 2001 ; Ng EK 2002*).

La faible quantité de matériel biologique nécessaire et l'automatisation de la technique de RT-PCR en « temps réel » permettent la quantification simultanée d'un grand nombre de gènes. Utilisée en première intention, la RT-PCR en temps réel s'est montré à la fois utile pour le diagnostic mais aussi pour la découverte de nouveaux gènes impliqués dans la physiopathogénie de différentes lésions.

# **PARTIE**

# **EXPERIMENTALE**

## *L'introduction du travail expérimental*

### **I – Le positionnement et la pertinence biologique**

Les épanchements péritonéaux inflammatoires non infectieux peuvent contenir des cellules tumorales dans le contexte des rares tumeurs primitives du péritoine (mésothéliome, tumeurs mucineuses...) ou dans le cadre de métastases de tumeurs. Les origines les plus fréquentes sont les cancers de l'ovaire et les cancers digestifs (estomac, colon, pancréas). Nous nous sommes intéressés particulièrement à ces tumeurs d'origine épithéliale glandulaire (adénocarcinome), de loin les plus fréquentes causes de cancer.

Le diagnostic précoce d'invasion péritonéale est crucial pour la survie du patient. Le traitement est adapté selon la tumeur primitive (*Hsieh SY 1995 ; Hassan R 2006 ; Fukumoto Y 2006 ; Noack F 2000, Hutton HL 2007, Davidson B 2006 ; Koppe MJ 2006 ; McCluggage WG 2005 ; Prat J 2005*). Le diagnostic peut être d'autant plus intéressant dans les formes très précoces, (ex bilan per-opératoire de résection tumorale) où les micro-invasions sont recherchées par lavage du résidu péritonéal (*Schmidt P 2001 ; Tamura N 2007 ; Wang Z 2005 ; Wolfrum F 2005 ; Yamamoto M 2007, Hruban RH 1998 ; Calaluze R 1998*).

Aucune des techniques actuelles (ou en cours de développement) ne permet l'analyse directe, automatisée, multiparamétrique (typage, morphologie, cinétique), de grands volumes de suspension cellulaire, pour la détection spécifique de cellules très minoritaires.

Les tests biologiques moléculaires pour le diagnostic *in vitro* sont nombreux, variés et en pleine expansion (immunodosages, immunodétection, biologie moléculaire).

Inversement, les explorations cellulaires sont encore très peu développées (*Racila E 1998*). Les principaux diagnostics sont encore effectués par des méthodes manuelles (analyse cytologique au microscope sur frottis colorés). Elles sont consommatrices de temps et dépendent de la forte qualification de l'opérateur. Elles sont donc coûteuses, peu sensibles, peu reproductibles et peu performantes. Pourtant les besoins sont grands notamment pour le diagnostic de cancers et d'hémopathies, d'infections bactériennes ou virales, le diagnostic anténatal, l'évaluation (et optimisation médico-économique) du traitement (maladie résiduelle, immunothérapies) et pour un dépistage précoce de récidives.

## II – Les objectifs de l'étude

Le diagnostic des carcinoses péritonéales est souvent difficile. La méthode de référence repose sur l'analyse manuelle par microscopie de frottis colorés. Cette technique est longue, pénible et très opérateur-dépendante. Sa sensibilité reste très modeste (60-70%). De plus, si les cellules tumorales peuvent être identifiées sur leurs atypies morphologiques, il n'est généralement pas possible d'identifier leur origine tissulaire. Cette information est pourtant très importante pour la conduite thérapeutique. L'immuno-cytologie peut aider à l'identification cellulaire en détectant des marqueurs protéiques. Cependant, ces marquages manquent de spécificité notamment du fait de la subjectivité et de l'imprécision de leur lecture. De plus, plusieurs marqueurs ont été décrits comme caractérisant partiellement certains types tumoraux mais l'immuno-cytochimie ne permet pas de les analyser en combinaison.

Le but de cette étude est de caractériser précisément les composants cellulaires de liquides d'ascites de différentes origines et d'évaluer la possibilité de ces techniques de distinguer la nature tumorale. Nous cherchons également à pouvoir orienter le diagnostic sur une origine tissulaire de la tumeur.

- 1- Caractérisation d'anticorps candidats. Mise au point de marquages multiples sur des lignées (4 à 5 marqueurs). Validation (sensibilité ; spécificité) sur des échantillons cliniques (liquides d'épanchement).
- 2- Détermination de marqueurs moléculaires. Mise au point de techniques de RT-PCR en temps réel. Evaluation de leur valeur diagnostique.
- 3- Validation sur des échantillons cliniques. Confrontation aux données cliniques et à l'examen cytologique classique.

Nous souhaitons trouver un moyen technologique pour la détection et la caractérisation de cellules tumorales dans des liquides péritonéaux ([Lostumbo A 2006](#); [Joachim G 1995](#)). Les cellules seront caractérisées par des critères morphologiques, des marqueurs glycoprotéiques ou leur précurseurs (ARNm).

## III – L'obtention des prélèvements

Les échantillons proviendront de deux groupes de patients : causes inflammatoires (cirrhose, insuffisance cardiaque), ou adénocarcinomes de différentes origines (digestives,



gynécologiques..). Par souci de confidentialité, les échantillons ont été clairement identifiés par un code anonyme et une date. L'inclusion définitive était conditionnée par la possibilité d'un diagnostic histologique précis et définitif et le consentement explicite du patient à participer à l'étude après information adéquate. Les données anamnestiques, cliniques, histologiques et évolutives concernant les patients et leur maladie ont été recueillies.

Les prélèvements sont des échantillons d'ascites prélevés à titre diagnostique ou thérapeutique. Différentes sources permettront d'obtenir des ascites d'origines inflammatoires ou de différentes causes tumorales : Institut de Cancérologie de la Loire, service de Gastro-entérologie du Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne et service de Médecine Interne de l'Hôpital de Saint-Chamond.

## **IV – La mise au point des techniques utilisées dans ce travail**

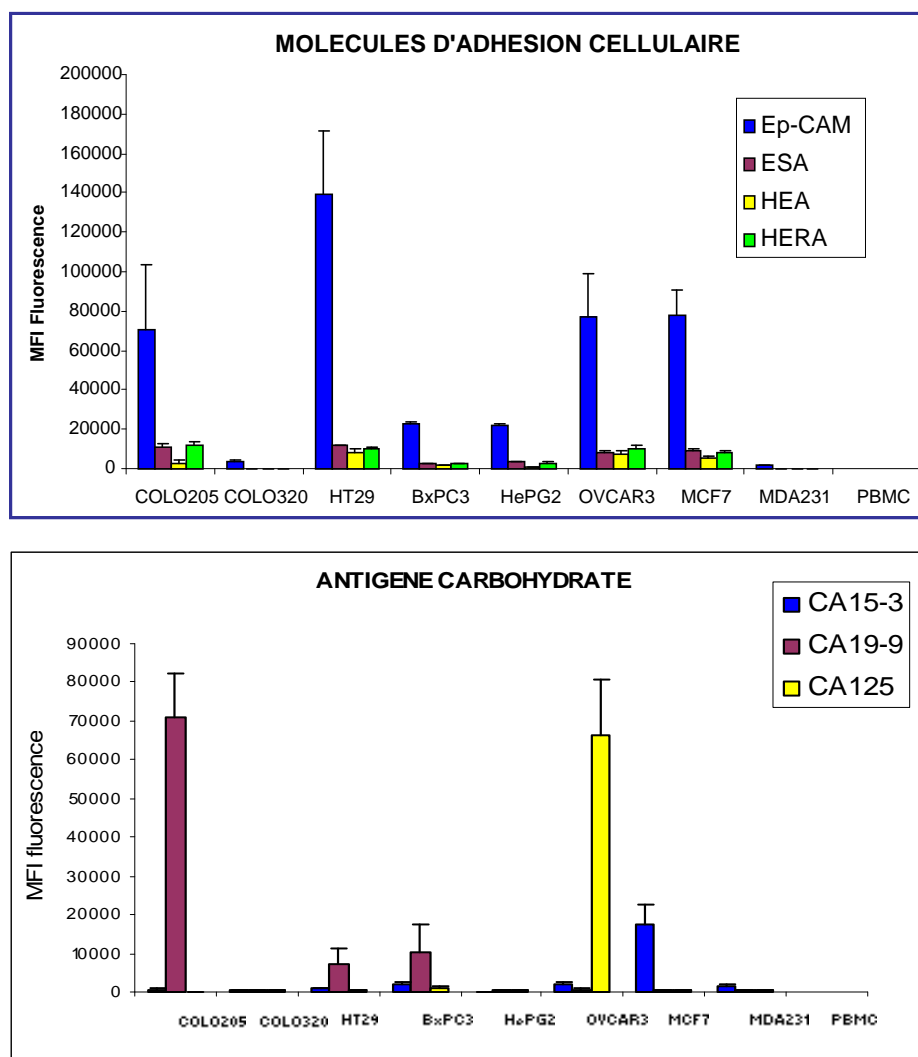
### **IV-1- La cytométrie en flux : mise au point des marquages quatre couleurs**

#### ***IV.1.1 – La sélection des anticorps pour le marquage quatre couleurs***

Les anticorps ont été sélectionnés sur des lignées cellulaires tumorales de différentes origines tissulaires (sein - ovaire - pancréas – colon – foie) ainsi que sur des cellules hématopoïétiques. Cette étude a été réalisée en triplicata afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats obtenus. L'anticorps anti-Ep-CAM marquait spécifiquement les lignées cellulaires tumorales d'origine épithéliale par rapport aux cellules hématopoïétiques, mais sans restriction du type tissulaire ( $p=0.019$ ) tandis que le CD45 était exprimé uniquement par les cellules leucocytaires (PBMC) ( $p=0.015$ ). Ces deux anticorps ont donc été sélectionnés pour marquer les cellules circulantes en marquages quatre couleurs afin de distinguer les cellules tumorales des cellules inflammatoires (figure 14). L'expression du marqueur CA15-3 n'était pas comparable entre les deux lignées cellulaires tumorales du sein, MDA231 et MCF7 ( $p=0.05$ ) (1405 MD, 17569 MD : médiane de fluorescence, respectivement). Par contre, son expression était significativement plus élevée pour la lignée MCF7 par rapport à toutes les autres lignées ( $p<0.05$ ). La différence d'expression au niveau des deux lignées de sein peut être expliquée par le niveau de dédifférenciation élevée de la lignée MDA231. L'anticorps anti-CA125 présentait une spécificité significative pour la lignée tumorale de l'ovaire Ovar3 (66176 MD) en comparaison avec les autres lignées (entre 195-800 MD,  $p=0.0005$ ). Nous avons donc conclu que l'anticorps anti-CA 15-3 et l'anticorps anti-CA125 étaient les plus intéressants pour marquer des cellules circulantes d'origine

gynécologique dans des épanchements. Les lignées coliques Ht 29, Bxpc3 et colo205 exprimaient de manière plus importante le CA 19-9 (6946 MD, 10061 MD ,70886 MD, respectivement) par rapport aux lignées de sein, d'ovaire, du foie et du poumon (entre 143 et 701 MD). La villine avait une expression notable uniquement sur les lignées Colo205, Ht29 et HepG2 (respectivement 6496 MD, 2231 MD, 5482 MD). Ces deux marqueurs ont été sélectionnés pour le marquage quatre couleurs destiné à la détection des cellules tumorales d'origine gastro-intestinale dans les épanchements (figure 14).

Enfin, nous avons étudié la sensibilité de ces marqueurs dans des épanchements très pauvres en cellules tumorales par simulation en réalisant des séries de dilutions des lignées cellulaires tumorales dans des PBMC. Ces tests ont été réalisés 3 fois à des temps différents. Nous avons observé que la sensibilité du marquage a permis de détecter 10 cellules cancéreuses parmi  $10^5$  PBMC avec les marqueurs CA 15-3, CA 125 et CA 19-9.



**Figure 14 :** Les anticorps sélectionnés selon l'origine tissulaire.

Certains anticorps montrent une spécificité relative pour une origine tissulaire alors que d'autres marquent les cellules épithéliales tumorales sans restriction de type.

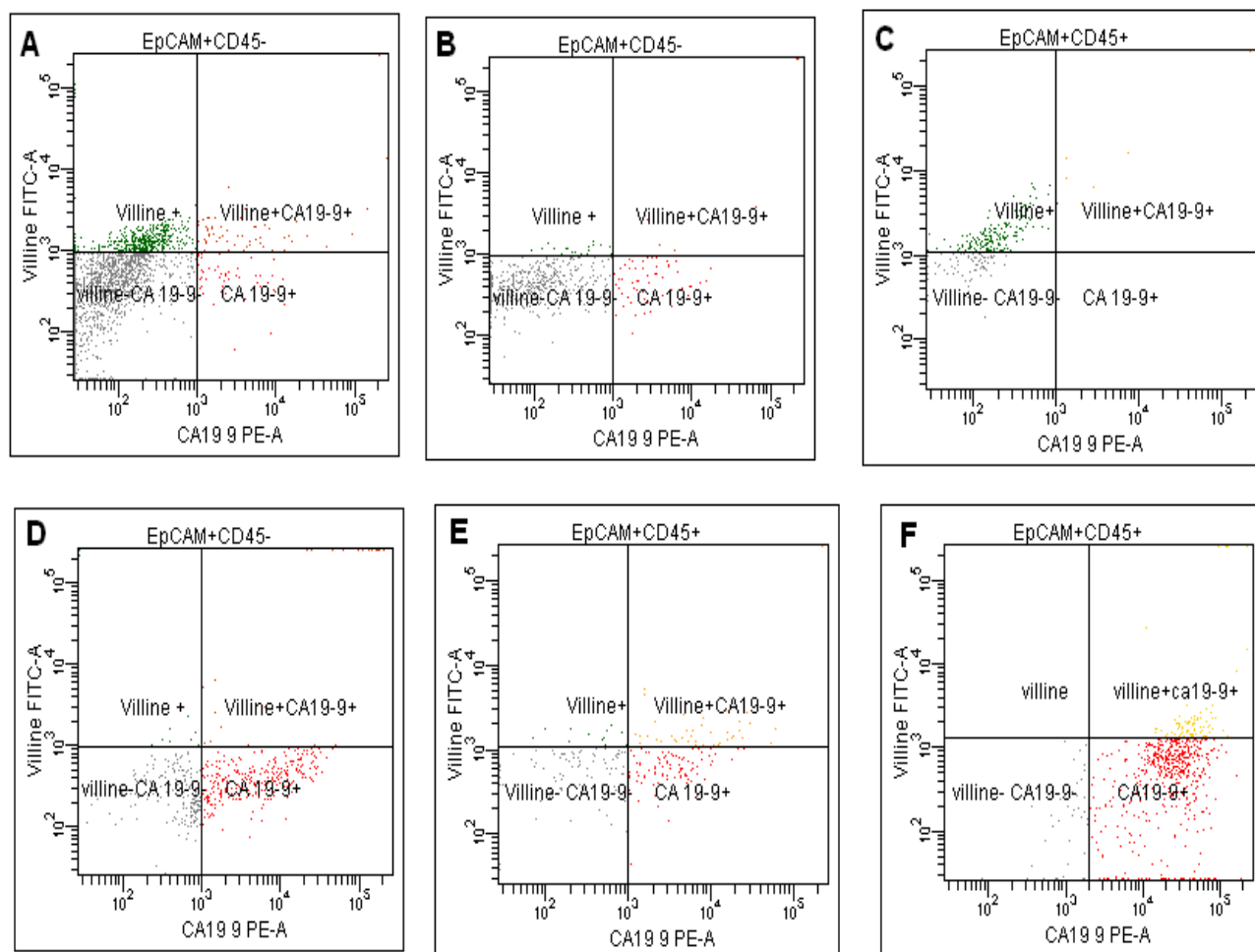
#### ***IV.1.2 – Le test du marquage quatre couleurs***

##### *IV.1.2.1 – Le marquage quatre couleurs pour les cellules d'origine gastro-intestinale*

Le marquage quatre couleurs pour les cellules tissulaires gastro-intestinales a été testé sur 3 lignées digestives, 2 du colon (HT29 et colo205) et 1 du pancréas (Bxpc3). 74.8% des cellules Colo205, 30.6% des cellules Ht29 et 52.6% des cellules Bxpc3 étaient positives pour ce marqueur. L'expression du marqueur CA 19-9 était différente entre les deux lignées du colon ( $p=0.0005$ ) et entre les lignées du colon et du pancréas (HT29- Bxpc3 ;  $p=0.0035$ ) (Colo205- Bxpc3 ;  $p=0.008$ ).

Néanmoins, le CA 19-9 présentait une spécificité pour les lignées digestives puisque 30 à 75 % des cellules étaient positives pour ce type tissulaire alors que pour les autres lignées (sein- ovaire- poumon-foie) les valeurs étaient toutes inférieures à 3% ( $p=0.0005$ ). La villine était peu exprimée par les cellules des lignées digestives du colon et du pancréas (entre 1 et 7% étaient positives). Bien que la villine soit normalement exprimée uniquement au niveau digestif ([Moll R, 1987](#)), d'après nos résultats sur les lignées, 30% des cellules HepG2 (foie) et entre 5-15% des cellules MCF7 et T47D (sein) étaient positives pour ce marqueur (figure 15).

En conclusion, le marquage des cellules gastro-intestinales quatre couleurs présentait une spécificité intéressante pour les lignées tumorales digestives avec le CA19-9. Par contre la villine n'a que peu d'intérêt pour la détection de ce type tissulaire. Ce marquage quatre couleurs a été testé sur les épanchements car les propriétés des cellules tumorales des lignées cellulaires ne peuvent pas être assimilées directement à celles des cellules cancéreuses présentes dans un organisme.



**Figure 15:** Spécificité du marquage quatre couleurs sur des lignées cellulaires d'origine gastro-intestinale.

A : Mcf7 ; B : Ovar3 ; C : MDA231 ; D : Bxpc3 ; E : Ht29 ; F: Colo205.

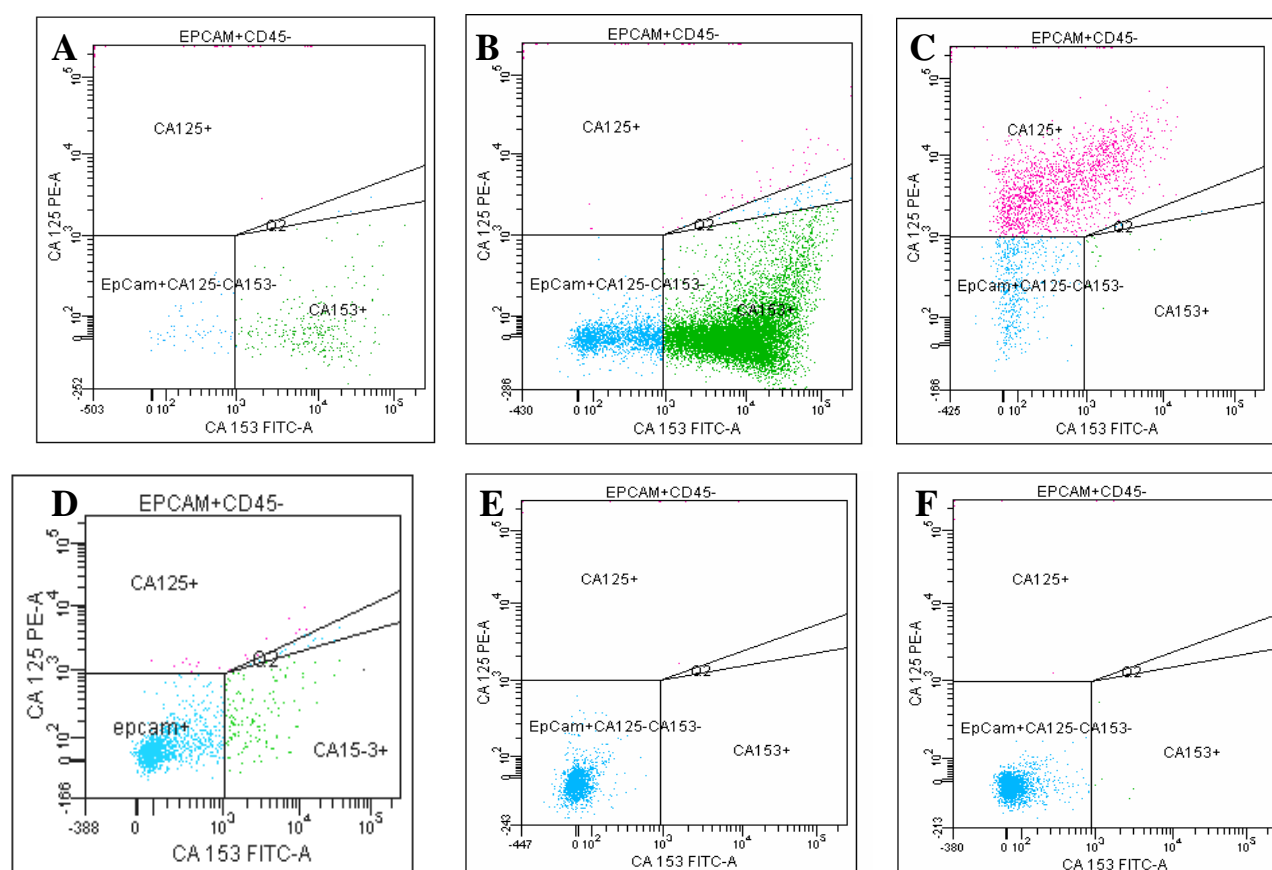
#### IV.1.2.2 - Le marquage des cellules d'origine gynécologique

Le marquage des cellules tissulaires gynécologiques a été testé sur 3 lignées cellulaires tumorales du sein (MCF7-T47D-MDA231). Entre 57 et 99.4 % des cellules MCF7 et T47D étaient positives pour le CA 15-3 contre 2-8% pour les cellules MDA231 ( $p=0.01$ ). Le fait que la lignée MDA231 soit très différenciée explique probablement cette différence entre lignées de même origine tissulaire et pour la suite de l'étude, seules les lignées T47D et MCF7 ont été considérées.

Les autres lignées (ovaire –colon –poumon –pancréas) n'étaient pas marquées par le CA15-3 sauf pour la lignée du pancréas (5-10% de cellules positives).

Le marqueur CA125 était significativement plus exprimé sur les cellules de la lignée ovarienne Ovar3 que sur les autres lignées ( $p=0.005$ ). De plus, entre 22 à 26% de cellules de cette lignée étaient marquées à la fois par le CA15-3 et par le CA125.

Bien que ces premières données aient été obtenues à partir de lignées cellulaires tumorales et non directement sur des cellules cancéreuses, l'utilisation associée dans un marquage quatre couleurs du CA15-3 et CA125 semblait présager une utilité pour le diagnostic des épanchements malins d'origine mammaire ou ovarienne (figure 16).



**Figure 16 :** Spécificité du marquage quatre couleurs sur des lignées cellulaires d'origine gynécologique.

A : MDA231 ; B : MCF7 ; C : Ovar3 ; D : Bxpc3 ; E : Ht29 ; F : Colo205.

#### IV.1.3 – Le marquage quatre couleurs sur les épanchements

Les épanchements constituent un milieu dans lequel différents types de cellules sont à l'état libre. Il a été très difficile de sélectionner des cellules épithéliales circulantes dans ces épanchements, nous avons alors essayé de sélectionner les cellules épithéliales via l'expression de l'Ep-CAM sans expression de CD45 et l'expression des marqueurs

spécifiques (CA 15-3, CA 125, CA 19-9, villine) et la sensibilité et la spécificité ont été étudiées comme sur les lignées cellulaires tumorales. Le seuil de détection a été défini de manière à ne prendre en compte que les lignées tumorales pour lesquelles le pourcentage de fluorescence Ep-CAM+CD45- était supérieur à celui obtenu pour les cellules hématopoïétiques (0.2%) et pouvant être considéré comme du bruit de fond (données non montrées).

Les deux marquages ont été testés sur 30 épanchements dont le diagnostic avait été établi par cytologie, pour définir leur efficacité dans le diagnostic des épanchements malins d'origines digestive et gynécologique. Le seuil de discrimination des cellules tumorales a été placé de manière à ne prendre en compte que les épanchements malins pour lesquelles le pourcentage de fluorescence Ep-CAM+CD45- était supérieur à celui obtenu pour les épanchements bénins (0.2%). Les deux marquages ont permis de distinguer les épanchements malins des épanchements bénins via le marquage Ep-CAM+CD45- (test  $X^2$  pour le marquage gynécologique  $p = 0.0026$  et pour le marquage gastro-intestinal  $p = 0.003$ ). Par contre, les deux marquages ne permettaient pas de différencier les épanchements d'origine digestive et gynécologique des autres types d'épanchements tumoraux (exemple : marquage présent sur les épanchements secondaires à un cancer du poumon).

En conclusion :

Nous avons mis au point des combinaisons de marquages pour identifier l'origine tissulaire des cellules tumorales en CMF. Cette méthode nécessite d'utiliser des anticorps directement couplés. Les anticorps spécifiques de cellules tumorales disponibles dans le commerce sont rarement couplés à des fluorochromes. Nous avons pu mettre au point un moyen permettant de distinguer des cellules tumorales d'origine mammaire ou ovarienne ou colique et pancréatique mélangées à des cellules hématopoïétiques (sang périphérique). Le protocole apparaît très sensible. Les résultats préliminaires montrent que les marquages sur des échantillons pathologiques sont bien moins spécifiques que sur les lignées. Nous avons notamment pu observer des marquages atypiques. La signification phénotypique et clinique de ces phénotypes aberrants reste à élucider.

La sensibilité de détection devrait permettre de descendre progressivement au dessous de 100 cellules par ml (seuil obtenu en cytométrie en flux) soit à moins de  $1/10^5$  cellules nucléées.

Cependant, cette technique n'a pas pu être utilisée pour la réalisation de notre projet du fait de sa spécificité insuffisante.

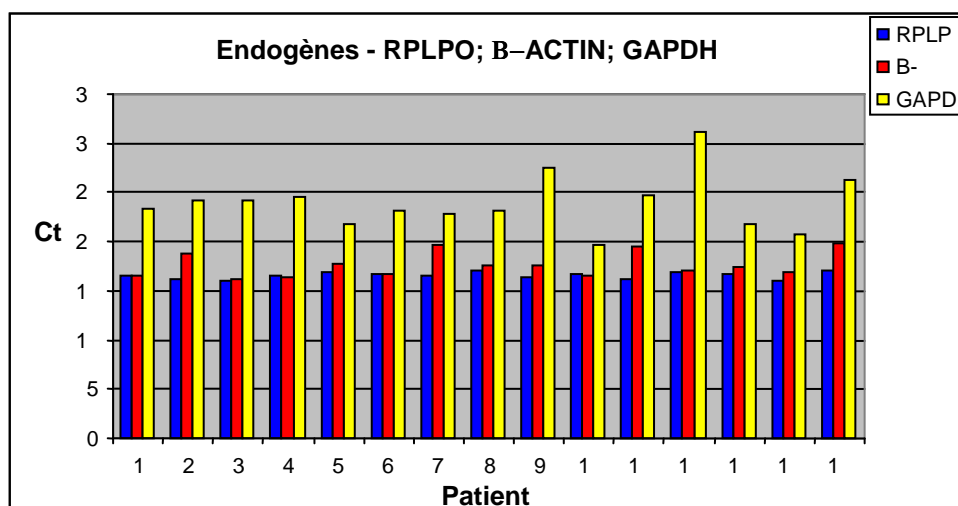
## **IV.2 - La biologie moléculaire : mise au point des techniques de RT-PCR quantitative**

Pour mettre au point les techniques nécessaires pour étudier l'expression des marqueurs moléculaires dans les épanchements péritonéaux, nous avons choisi la RT-PCR comme technique la plus sensible et la plus spécifique à appliquer dans ce travail, et pour obtenir des résultats fiables et reproductibles, nous avons été amenés à optimiser toutes les étapes de la RT-PCR, de la méthode d'extraction de l'ARN, le traitement de l'ARN à la DNase, le choix de la reverse transcriptase et des amorces de la réaction RT-PCR, la quantité et la pureté de l'échantillon de l'ADNc et la recherche d'un gène de ménage. Nous avons pu démontrer l'importance de la qualité de l'ARN obtenu à partir de l'épanchement péritonéal.

### ***IV.2.1 – La recherche d'un gène de ménage approprié***

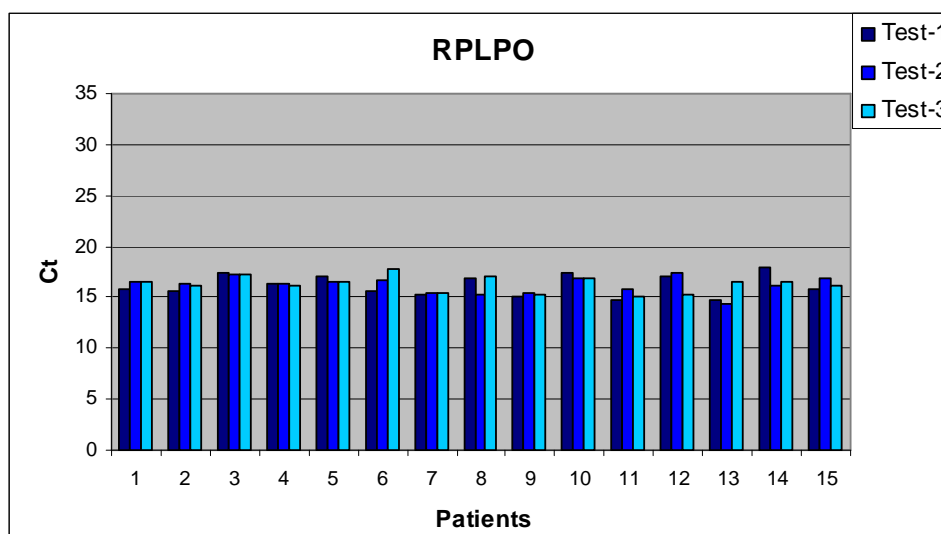
Pour interpréter les mesures quantitatives de l'expression génique dans les échantillons liquidiens, une normalisation est nécessaire pour corriger les variations introduites au cours de la préparation de l'échantillon telles que la qualité de l'ARN ou l'efficacité de la PCR. Dans de nombreuses études, un seul gène de ménage est utilisé pour la normalisation. Dans cette étude, nous avons mesuré par RT-PCR quantitative en temps réel l'expression de trois gènes fréquemment utilisés comme gènes de ménage dans 15 échantillons de liquide péritonéal des patients. Ces gènes sont la  $\beta$ -actine, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la protéine ribosomale (RPLPO).

Les résultats de la figure 17 montrent que le RPLPO est le gène de référence le plus stable et le plus homogène pour les échantillons de notre étude. La GAPDH était moins stable et très variable sur les différents échantillons. Pour certains patients, la  $\beta$ -actine présentait un double pic au niveau de la courbe de dissociation.



**Figure 17 :** Comparaison de l'expression de plusieurs gènes de ménage dans les cellules de liquides péritonéaux de 15 patients.

Nous avons ensuite vérifié que les résultats obtenus pour chaque patient étaient reproductibles dans le temps et avec différentes préparations d'ARN totaux conservés à -80°C (figure 18).



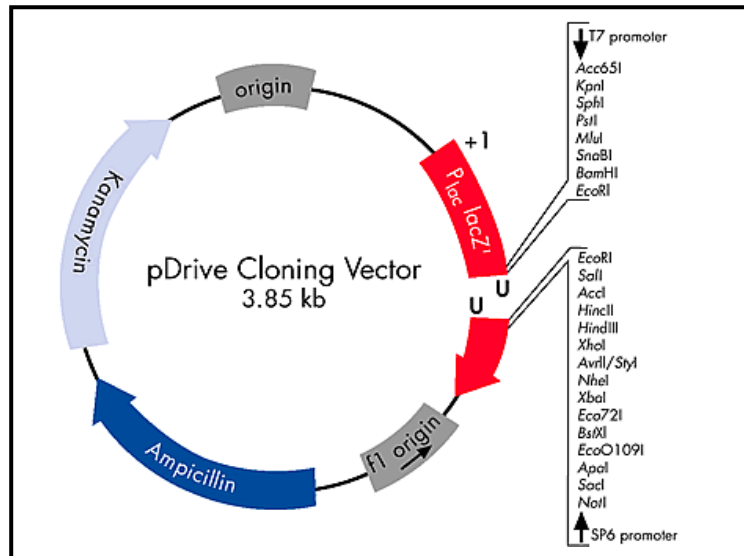
**Figure 18 :** Reproductibilité des résultats obtenus avec le gène RPLPO

Nous avons validé le gène endogène de contrôle RPLPO en RT-PCR quantitative pour analyser l'expression des gènes dans les ascites des patients.



#### IV.2.2 – Le clonage dans le vecteur pDrive du gène de ménage RPLPO et préparation d'une gamme standard

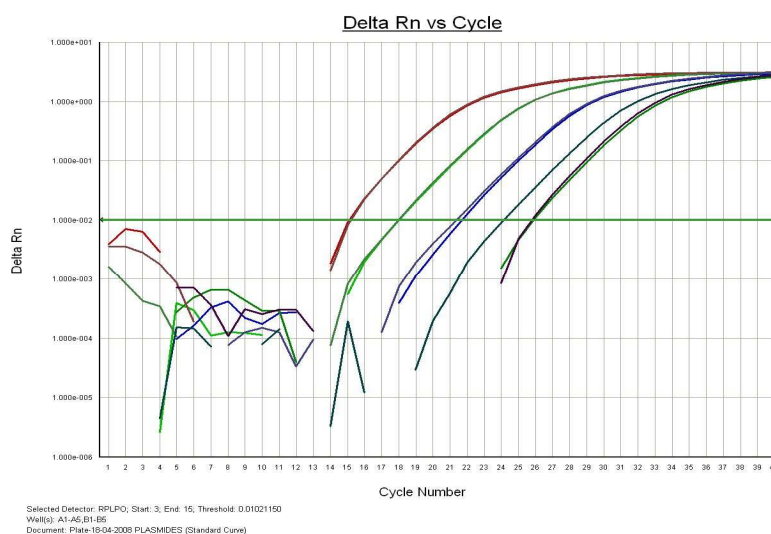
Nous avons préparé par clonage de la séquence d'ADN amplifiée dans le vecteur pDrive (3850 bp) un plasmide de référence spécifique du gène RPLPO (figure19).



**Figure 19 :** Le vecteur pDrive

Nous avons pu déterminer un nombre de copies du gène RPLPO par rapport à la concentration du plasmide ce qui nous a permis de définir une gamme standard du gène RPLPO.

Pour la gamme standard, une série de dilutions de  $10^6$  copies à 500 copies a été préparée (figure 20).

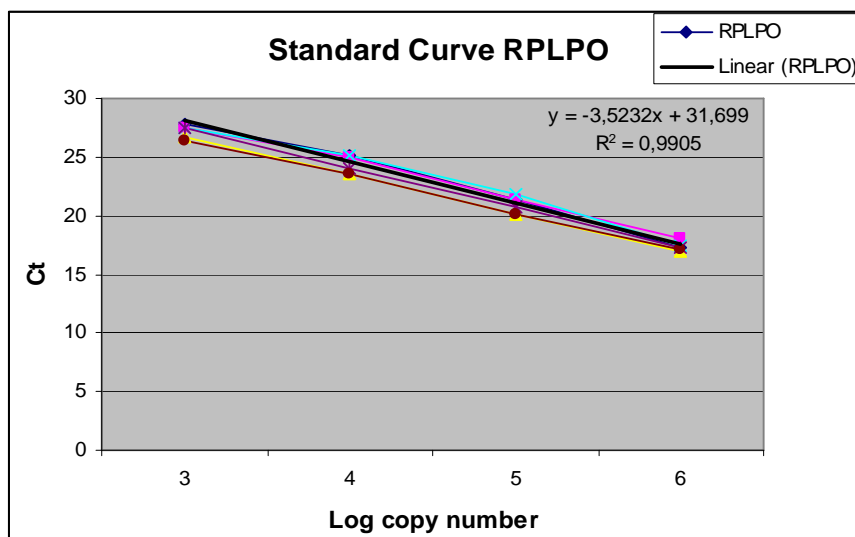


**Figure 20 :** Résultats de PCR quantitative en temps réel de la gamme de plasmide RPLPO.

Les points de gamme sont  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  et 500 copies.

### Le calcul d'une droite étalon du gène RPLPO

Une courbe standard a été calculée en utilisant l'analyse de régression linéaire. La courbe d'étalonnage a montré une relation linéaire entre les valeurs de Ct et le logarithme du nombre de copies (figure 21).



**Figure 21 :** Calcul de la droite de référence montrant le niveau de fluorescence exprimé en ct en fonction du log du nombre de copies.

#### *IV.2.3 – La mise en place de la RT-PCR quantitative pour la quantification de l'ARNm de différents marqueurs tumoraux*

La quantification de l'expression des marqueurs moléculaires au niveau de l'ARNm devrait être plus sensible et plus informatif pour la clinique. Notre travail a donc porté sur la mise au point d'une méthode de RT-PCR qui permette d'obtenir des résultats fiables, standardisés et reproductibles pour la quantification de l'expression de ces marqueurs moléculaires dans les épanchements malins.

Nous avons donc choisi d'étudier l'expression de différents marqueurs moléculaires au moyen de la RT-PCR quantitative en temps réel afin d'évaluer leur intérêt dans le diagnostic des épanchements malins et dans le diagnostic différentiel entre épanchements malins et bénins. Les marqueurs ont été choisis selon la littérature et par rapport à leur intérêt en clinique.

Nous avons aussi choisi d'utiliser une méthode de quantification absolue pour éviter le biais du gène de ménage en utilisant des courbes standard spécifiques pour chaque gène mesuré.

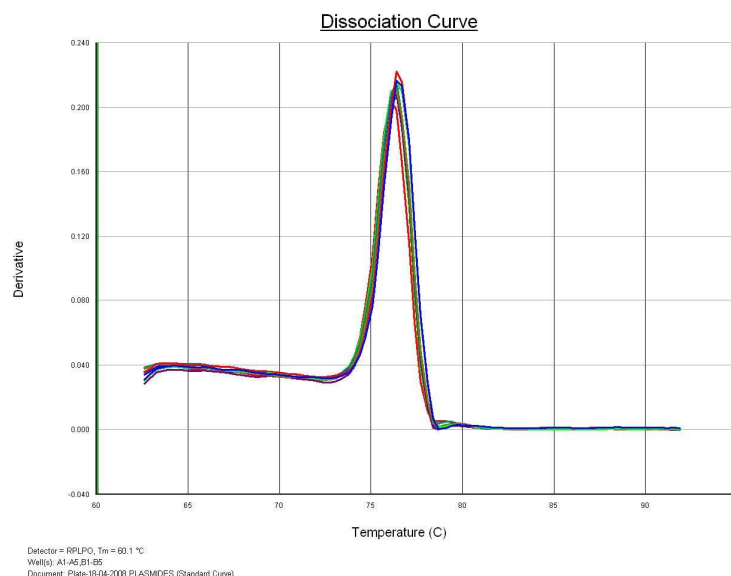
#### IV.2.3.1 – Le dessin des amorces

Le logiciel Primer Express d'Applied Biosystems a été utilisé pour déterminer des amorces spécifiques pour chaque gène étudié. Chaque oligonucléotide a été testé sur le programme BLAST pour vérifier la spécificité des séquences sélectionnées.

**Tableau 2 : Séquence des amorces choisies à l'aide du logiciel PrimerExpress pour chaque marqueur tumoral étudié.**

Gène	Amplicon (bp)	Sequence des amorces sense et antisense	Accession number	Exon
RPLPO	98	5'-GGCGACCTGGAAGTCCAACACTAC-3' 5'-AGACAATGTGGGCTCCAAGC-3'	NM_001002	2 -3
EP-CAM	68	5'-CTGAATTCTCAATGCAGGGTCTAA-3' 5'-AACTGCTATCACCACAACCACAA-3'	NM-002354	7
CEA	58	5'-GCCCTGGTTGCTCTGATAGC-3' 5'-CGGTCTTCCCGAAATGCA-3'	NM-001712	6
CLDN1	63	5'-GCAACCCGTGCCTTGATG-3' 5'-GGTGGCCACAAAGATTGCTATC-3'	NM-021101	2
CLDN4	54	5'-GCTGGCCAGGATAGCTTAACC-3' 5'-GCCAACGCCGATGCA-3'	NM-001305	1
CLDN7	188	5'-GGCCACTCGAGCCCTAATG-3' 5'-CATACCAGGAGCAAGCTACCAA-3'	NM-001307	2-3
CLDN18	70	5'-CACCTCCGTGTTCCAGTACGA-3' 5'-GCATTCGGTGAAGCCTGAA-3'	NM-016369	1
CK19	64	5'-GAACCAAGTTTGAGACGGAACAG-3' 5'-CGCAGGCCGTTGATGTC-3'	NM-002276	2-3
CK20	61	5'-CTGCAAAATGCTCGGTGTGT-3' 5'-TGAAGTCCTCAGCAGCCAGTT-3'	NM-019010	2
MUC1	59	5'-ACGGGTTCTGGTCATGCAA-3' 5'-TGGGTAGCCGAAGTCTCCTTT-3'	NM-002456	2
MUC5AC	55	5'-TGAGCTGGGATGCCCAAAT-3' 5'-GGCCCAGGTCTCACCTTTC-3'	NM-017511	1
MUC16	69	5'-CGCTGGACATAAACTTGAATCT-3' 5'-TTCTCTCATATGGGCTGCTTTTC-3'	NM-024690	3
VILL1	58	5'-CAGGTGTGGCGCATTGAG-3' 5'-GGCCTAGCCACTTGGAATCC-3'	NM-007127	10-11

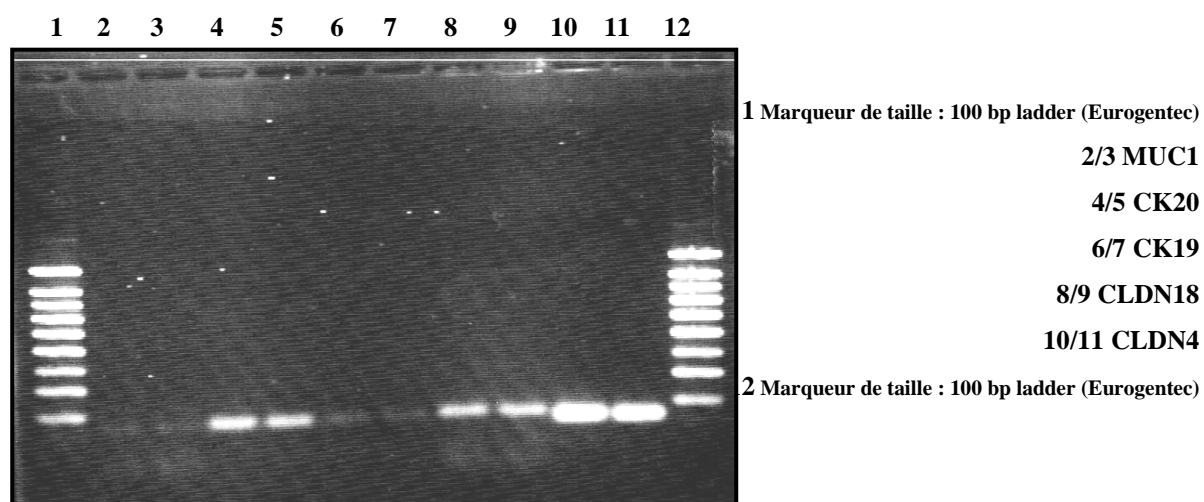
Chaque couple d'amorce a été testé en ajoutant une courbe de dissociation à la suite du programme PCR : la présence d'un seul pic pour chaque échantillon confirme la spécificité de la PCR (figure 22).



**Figure 22 :** *Courbe de dissociation pour l'amplicon RPLPO*

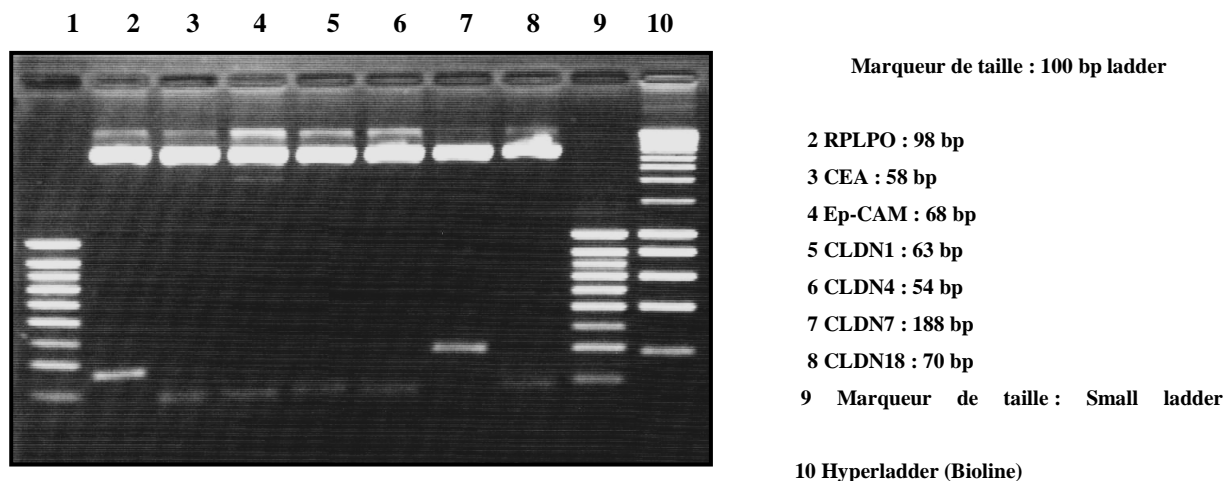
#### IV.2.3.2 – La réalisation d'une courbe étalon pour chaque gène des marqueurs tumoraux

De la même manière que pour le gène RPLPO, nous avons préparé un plasmide de référence dans le vecteur pDrive pour chaque gène étudié par clonage. Chaque gène est amplifié et le produit PCR est vérifié par électrophorèse (figure 23). La bande d'agarose contenant l'amplicon est découpée et l'ADN est purifié pour le clonage par les techniques classiques.



**Figure 23 :** *Electrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose révélés sous UV au bromure d'éthidium.*

La bonne insertion de l'amplicon dans le vecteur pDrive (3850 bp) est vérifiée par digestion enzymatique (figure 24)



**Figure 24 :** Clonage dans le vecteur pDrive et vérification des clones par digestion par l'enzyme de restriction *EcoRI*.

Tous les plasmides ont été vérifiés par séquençage. La PCR en temps réel a été réalisée sur des dilutions de plasmides par chaque gène étudié. Les paramètres des droites étalon obtenues indiquent que les conditions de PCR sont très efficaces ( $R^2 = 0,99$ ) et que la fluorescence mesurée est bien proportionnelle aux quantités présentes dans les échantillons (pente théorique = -3.32).

**Tableau 3 :** Paramètres des droites standard obtenues pour chaque marqueur tumoral.

Gène	Pente	R <sup>2</sup>
RPLPO	-3,3	0,99
EP-CAM	-3,12	0,99
CEA	-3,37	0,99
CLDN1	-3,31	0,99
CLDN4	-3,39	0,99
CLDN7	-3,31	0,99
CLDN18	-3,39	0,99
CK19	-3,43	0,99
CK20	-3,4	0,99
MUC1	-3,16	0,99
MUC5AC	-3,28	0,99
MUC16	-3,09	0,99
VILL1	-3,24	0,99

Nous avons pu mettre en place des conditions optimales pour l'étude quantitative de plusieurs marqueurs tumoraux par PCR en temps réel.

#### *IV.2.3.3 – La mesure du niveau d'expression de l'ARNm circulant dans le sérum*

Nous avons pu mettre au point une RT-PCR quantitative en temps réel pour mesurer le niveau d'expression des différents marqueurs moléculaires dans la première partie de ce travail (sur des épanchements péritonéaux) qui nous a donné des résultats fiables pour détecter des cellules tumorales dans ces épanchements liquidiens.

Pour la suite de l'étude, nous avons choisi les marqueurs ACE et CLDN4 qui nous ont paru les plus intéressants pour étudier les ARNm circulant dans le sérum de 35 patients atteints de cancer de différents organes et les comparer avec des sujets normaux.

Comme nous avons utilisé le nombre de copies de RPLPO pour normaliser le nombre de copies des gènes chez tous les patients étudiés, aucune différence significative dans le nombre de copies du gène RPLPO a été observée chez les patients cancéreux ou chez les sujets normaux ( $P > 0,05$ ).

## *Le premier article :*

### **Introduction**

Le diagnostic différentiel entre effusions bénignes et malignes constitue un problème clinique important. La présence de cellules cancéreuses dans les épanchements est une question simple lorsqu'un grand nombre de cellules atypiques est présent, mais peut poser plus de difficultés lorsque ces cellules sont peu nombreuses et difficilement visibles. Pour améliorer la détection de cellules cancéreuses dans les effusions, de nouvelles méthodes très sensibles et spécifiques semblent utiles.

L'analyse cytologique est la méthode généralement adoptée pour identifier les cellules malignes dans les liquides péritonéaux et pleuraux, mais elle ne semble pas être assez sensible (de 40 à 60%). L'étude moléculaire des biomarqueurs pourrait constituer une approche complémentaire intéressante pour augmenter l'efficacité du diagnostic dans ce type d'échantillons biologiques. Il est probable aussi que l'utilisation de multiples marqueurs peut être nécessaire pour obtenir une corrélation optimale avec l'histologie des cancers.

Pour ces raisons, notre objectif était d'améliorer le diagnostic cytologique de malignité par la quantification des marqueurs moléculaires CLDN1, CLDN4, CLDN18 et le CEA, Ep-CAM, CK19, CK20, MUC1, MUC16. Cependant, malgré plusieurs études, l'expression quantitative d'ensemble de ces marqueurs chez les patients cancéreux restent contradictoires et peu concluantes et n'a pas encore été utilisée pour la détection de cellules tumorales dans les épanchements séreux.

Dans notre étude nous avons quantifié l'expression de ces marqueurs par RT-PCR quantitative en temps réel dans les épanchements pleuraux ou péritonéaux chez les patients atteints de cancer évalué en comparaison des patients bénins atteints de cirrhose hépatique ou d'insuffisance cardiaque et d'évaluer leur utilité en tant que marqueurs de diagnostic différentiel des épanchements malins.

ORIGINAL ARTICLE

## Improvement of malignant serous effusions diagnosis by quantitative analysis of molecular claudin 4 expression

Fauzia Mohamed<sup>1</sup>, Nadine Vincent<sup>1</sup>, Michèle Cottier<sup>2</sup>, Michel Peoc'h<sup>3</sup>, Yacine Merrouche<sup>4</sup>, Brigitte Patouillard<sup>5</sup>, Stéphane Paul<sup>1</sup>, and Christian Genin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departments of Immunology, <sup>2</sup>Cytology, <sup>3</sup>Pathology and <sup>4</sup>Gastroenterology, University Hospital Center, and <sup>5</sup>Cancerology Institute of Loire, Saint-Etienne, France

### Abstract

Claudin gene expression is frequently altered in human cancers. Our aim was to improve the cytology diagnosis of malignancy in serous fluids with the quantification of claudins compared with various classic molecular markers using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. Peritoneal or pleural effusions of 56 patients were assessed as malignant from histological analysis and 19 as benign. Claudin 4 was the most significantly upregulated (68%) marker in patients with malignant effusions. In cytologically negative malignant effusions, claudin 4 was found increased in 8/18 fluids. Quantitative RT-PCR is a sensitive method for the detection of free cancer cells in serous effusions.

**Keywords:** Biomarkers; Claudin 4; effusions; quantitative RT-PCR

**Abbreviations:** RT-PCR, quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction; CLDN, claudin; TJ, tight junction; CLDN3, claudin 3; CLDN4, claudin 4; CLDN7, claudin 7; CLDN1, claudin 1; CLDN10, claudin 10; CLDN18, claudin 18; CEA, carcinoembryonic antigen; Ep-CAM, epithelial cell adhesion molecule; CK19, cytokeratin 19; CK20, cytokeratin 20; MUC1, mucin 1; MUC16, mucin 16; RPMI, RPMI-1640 medium; FCS, fetal calf serum; DMSO, dimethylsulfoxide; cDNA, complementary DNA; NTC, non-template control; RPLPO, ribosomal protein P0; Ct, threshold cycle; mRNA, messenger RNA; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ICC, immunocytochemistry; MUC5AC, mucin 5AC.

### Introduction

The differential diagnosis between benign and malignant effusions represents a critical clinical problem. Cytological analysis is the method usually adopted to identify malignant cells in peritoneal and pleural fluids, but it seems not to be sensitive enough (40–60%). Molecular study of biomarkers could represent an interesting complementary approach to increase the efficiency of the diagnosis in these biological samples.

The claudin (CLDN) genes encode a family of 24 proteins essential in tight junction formation and function (TJ) in epithelial and endothelial cells (Tsukita & Furuse 2000, Lim et al. 2008, Krause et al. 2008, Kulka et al. 2009).

Immunohistochemical localization of CLDN indicated that CLDN were expressed along the entire length of the lateral plasma membranes between epithelial cells, including apical areas containing TJ structures (Kulka et al. 2009). It is thought that various claudin family members can confer different properties to epithelial cell permeability and account for some of the selective variability of different barriers. Two distinct pathways are known for this transport: the transcellular and paracellular pathways in which materials move across plasma membranes and TJs, respectively (Spring 1998, Tsukita et al. 2000, Hou et al. 2008). The exact combination of claudin proteins within a given tissue is thought to determine the selectivity and strength of the TJs. Recent gene

Address for Correspondence: C. Genin, Department of Immunology, CHU de Saint Etienne, 42055 Saint Etienne Cedex 2, France. Tel: 33 (0) 4 77 82 83 79. Fax: 33 (0) 4 77 82 84 93. E-mail: Christian.Genin@chu-st-etienne.fr

(Received 27 November 2009; revised 27 January 2010; accepted 27 January 2010)

ISSN 1354-750X print/ISSN 1366-5904 online © 2010 Informa UK Ltd  
DOI: 10.3109/13547501003658114

<http://www.informahc.com/bmk>



expression profiling analyses have shown that claudin gene expression is frequently altered in various cancers (Morin 2005, Swisshelm et al. 2005). Several studies have been done by immunohistochemistry showing an expression of CLDN in tumour tissues. For example, CLDN3 and CLDN4 are frequently upregulated in ovarian, breast, prostate and pancreatic tumours (Michl et al. 2001, Hough et al. 2000, Long et al. 2001, Rangel et al. 2003, Kominsky et al. 2004, Tokes et al. 2005). CLDN7 is downregulated in breast and head and neck cancer, but elevated in gastric cancer (Kominsky et al. 2003, Johnson et al. 2005). On the other hand, loss of CLDN7 appears to be associated with a more aggressive behaviour of breast carcinoma (Kominsky et al. 2003, Sheehan et al. 2007). CLDN1 is typically downregulated in various cancers, but has also been reported to be elevated in other studies. CLDN1, CLDN10 and CLDN18 have been reported to have prognostic value in colon cancer, hepatocellular carcinoma and in gastric cancer, respectively (Hewitt et al. 2006, Sanada et al. 2006, Resnick et al. 2005, Hoevel et al. 2002, Kramer et al. 2000, Cheung et al. 2005). Moreover, claudins are surface proteins and for this reason may represent useful target for various therapeutic strategies. However, the expression patterns of the whole family of claudins in cancer and normal tissues have not been well characterized.

In this study, we evaluated the quantitative expression of CLDN1, CLDN4 and CLDN18 in comparison with a panel of molecular classic markers for the detection of cancer cells in serous effusions, and to assess their usefulness as differential diagnostic markers of primary tumour tissues. It is likely that the use of multiple markers may be required to achieve optimal correlation with histology of distinct original malignant diseases. For these reasons, we have also decided to evaluate in our cohort the quantitative expression of carcinoembryonic antigen (CEA) which is one of the most common specific markers of tumours (Passebosch-Faure et al. 2005), the epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) which is expressed in most of epithelial cells and epithelial tumours and usually overexpressed in the latter (Zhang et al. 2007, Winter et al. 2003), two members of the cytokeratin family (CK19, CK20), and two of the mucin family (MUC1, MUC16) which are usually preserved in neoplastic cells, and may be useful to classify the primary sites of digestive or gynaecological cancers and may be useful in predicting the primary sites of digestive cancers (Backus et al. 2005, Lee et al. 2003, Yu et al. 2001). Despite several studies, the overall quantitative expression of these markers in cancer patients remains conflicting and inconclusive and is still not used to detect tumour cells in serous effusions.

In the present study, we have analysed the expression of CLDN1, CLDN4, CLDN18 and CEA, Ep-CAM, CK19, CK20, MUC1 and MUC16 by quantitative real-time

reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in peritoneal or pleural effusions in patients with cancer assessed by cytological analysis or with hepatic cirrhosis or cardiac failure as controls.

## Methods

### Patients

Serous effusions of 75 patients (43 female patients, age range 42–90 years and 32 male patients, age range 48–86 years), (67 ascitic and eight pleural fluids) were collected prospectively from the Outpatients Department, Cancerology Institute of Loire and Gastro-Enterology, University Hospital Center of Saint Etienne and from the Department of Internal Medicine, Hospital Center of Saint-Chamond. The effusion fluids were collected in 2 l autoclaved containers with 5000 units of heparin.

All effusions had a reliable diagnosis documented by histological analysis of primary tumours which is the standard in this study, and follow-up of the patients could connect the effusion with the primary tumour. The pleural or peritoneal biopsies were performed only for the diagnosis of mesothelioma or if the primary tumour was not detected. Effusions from 19 patients with non-malignant disease caused by hepatic cirrhosis (15) or cardiac failure (4) were used as controls.

Among the 56 malignant effusions, 18 (32%) were cytologically negative. The cancer primary sites of patients with malignant serous effusions are detailed in Table 3. This study was approved by the institutional ethics committee.

### Preparation of cells from serous effusions

Each fluid sample was centrifuged in 50 ml tubes at 300g for 10 min at room temperature. Then, pellets were pooled together, washed once and resuspended in RPMI 1640 with 10% FCS. Fractions of 900 µl were distributed in 1.5 ml cryotubes containing 100 µl DMSO and stored in liquid nitrogen until use. When needed, aliquots were thawed in a 37°C water bath and then washed once with Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free NaCl solution (0.01 mol l<sup>-1</sup>), and a cell count was done.

### RNA extraction

Total RNA was extracted by using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 600 µl of RLT solution was used to lyse the cells. The lysed cells were homogenized by the use of a column arise, and then 600 µl of ethanol 70% was added and the RNA was treated by the RNase-free DNase Set (Qiagen). The solution was then washed with 600 µl RW1 buffer and 500 µl of REP buffer. RNA was

eluted in 30 µl of RNase-free water. Purified RNA were quantified by spectrophotometry at 260 nm and stored at -80°C before use.

#### Reverse transcription PCR

Reverse transcription was conducted with the Omniscript RT Kit for RT-PCR (Qiagen) following the manufacturer's instructions; 2 µl of DNTP 5 mM, 2 µl of buffer mix 10x, 1 µl of Oligo DT, 1 µl of ORT and 0.5 µg total RNA in 20 µl final volume were incubated for 1 h at 37°C, then the obtained cDNA was stored at -20°C before use.

The primers were designed using the Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers for RPLPO were also used to check RNA integrity and the efficiency of the reverse transcription step. The sequences of the primers were designed to span splice junctions or in two different exons so that genomic DNA contamination could be monitored (Table 1).

#### Quantitative real-time PCR

PCR reactions were performed with the ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). PCR amplifications were performed in a total volume of 25 µl comprising 5 µl of cDNA template diluted 1:50 and 20 µl Master Mix Syber Green PCR (Applied Biosystems) and primers at 200 nM. The program included a PCR initial denaturation of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Each experiment included non-template control (NTC) for which the cDNA was replaced by pure water. All PCR reactions were performed in duplicate or triplicate.

Each pair of primers was tested by adding a dissociation curve as a result of PCR. The presence of a single peak for each sample confirmed the specificity of the PCR.

#### Preparation of the standard curve

The plasmids RPLPO, CLDN1, -4, -18, CEA, Ep-CAM, CK19, -20, MUC1 and -16 were obtained by cloning the amplified DNA sequence in the vector pDrive (3850 bp). The RPLPO reference plasmid was used to standardize and determine the number of RPLPO copies compared with the concentration of plasmid allowing us to define a standard range of gene RPLPO (897 ng µl<sup>-1</sup>). For the standard range, a series of dilutions of 10<sup>4</sup> copies to 500 copies were used. NTC controls were also included where DNA has been replaced by pure water.

#### Standard curve

RPLPO was chosen in this study as a housekeeping gene. A standard curve was calculated using linear regression analysis. The standard curve showed a linear relationship between the values of Ct and the logarithm of the initial plasmid copy number. The amount of product in a sample was determined by interpolation from a standard curve of Ct values generated by the serial dilution plasmid ranging from 10<sup>4</sup> to 500 copies of each plasmid.

#### Statistical analysis

The comparison of RPLPO mRNA levels among all the patients examined was performed using the non-

Table 1. Sequences and features of the primers used for RT-PCR.

Name	Accession number	Sequence of sense and antisense primers	Localization	Length
RPLPO	NM-001002	5'-GGCGACCTGGAAGTCCAACTAC-3' 5'-AGACAATGTGGGCTCCAAGC-3'	Exon 2-3	98 bp
CLDN1	NM-021101	5'-GCAACCCGTGCTTGATG-3' 5'-GGTGGCCACAAAGATTGCTATC-3'	Exon 2	63 bp
CLDN4	NM-001305	5'-GCTGGCCAGGATAGCTTAACC-3' 5'-GCCAACGCCGATGCA-3'	Exon 1	54 bp
CLDN18	NM-016369	5'-CACCTCCGTGTTCCAGTACGA-3' 5'-GCATTGGGTGAAGCC TGAA-3'	Exon 1	70 bp
CEA	NM-001712	5'-GCCCTGGTTGCTCTGATAGC-3' 5'-CGGTCTTCCCGAAATGCA-3'	Exon 6	58 bp
Ep-CAM	NM-002354	5'-CTGAATTCTCAATGCAGGGTCTAA-3' 5'-AACTGCTATCACCACAACCACAA-3'	Exon 7	68 bp
CK19	NM-002276	5'-GAACCAAGTTTGAGACGGAACAG-3' 5'-CGCAGGCCGTTGATGTC-3'	Exon 2-3	64 bp
CK20	NM-019010	5'-CTGCAAAATGCTCGGTGTGT-3' 5'-TGAAGTCTCAGCAGCCAGTT-3'	Exon 2	61 bp
MUC1	NM-002456	5'-ACGGGTTCTGGTCATGCAA-3' 5'-TGGGTAGCCGAAGTCTCCTTT-3'	Exon 2	59 bp
MUC16	NM-024690	5'-CGCTGGACATAAACTTGAATCT-3' 5'-TTCTCTCATATGGGCTGCTTTTC-3'	Exon 3	69 bp

parametric Kruskal-Wallis test. Considering that we defined a positivity threshold in copy number for each marker, values measured by quantitative RT-PCR were expressed as positive or negative. mRNA values from the various markers studied in groups of patients with or without serous malignant fluid were compared using the  $\chi^2$  test. A  $p$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Normalization of the method

To measure gene expression quantitatively in biological specimens, normalization was necessary to correct expression data due to variations introduced during sample preparation such as the quality of RNA or PCR efficiency. In most previous studies, a single housekeeping gene was used for normalization.

In 15 samples of peritoneal fluids, the expression of three different genes ( $\beta$ -actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the ribosomal protein (RPLPO) frequently used as housekeeping genes to study the stability and the homogeneity were measured by quantitative RT-PCR. We found that RPLPO was the most adapted gene in such samples, while GAPDH and  $\beta$ -actin were demonstrated as quite variable housekeeping genes (data not shown).

We then checked that the results were reproducible over time and with different preparations of total RNA for each patient (data not shown).

### Real-time PCR standard curves obtained for the different genes studied

Quantitative real-time PCR monitoring the fluorescent signal of each cycle allowed sensitive and specific detection of CLDN1, CLDN4, CLDN18, CEA, Ep-CAM, CK19, CK20, MUC1 and MUC16 mRNA to determine the absolute number in the different samples of serous fluids from patients. For each of these genes, the assay limiting value for sensitivity was found to be 500 copies. Each curve was obtained after three experiments repeated and constructed using data by plotting the Ct (threshold cycle) value against the input cDNA concentration (serial dilutions of pDrive-vector) of samples. The calculated threshold cycle (Ct) reflects the quantity of the starting targets, with lower Ct values reflecting a greater amount of starting target molecules (Oki et al. 2002). The Ct value decreased linearly with increasing target quantity from 500 copies to 1 million copies. For the different genes studied, the values for patient samples were calculated with reference to the standard curve (Figure 1 and Table 2). All plasmids were verified by sequencing. The real-time PCR was performed on

dilutions of plasmids for each gene studied. The parameters of calibration lines obtained indicate that the PCR conditions were very efficient ( $R^2 = 0.99$ ) and the measured fluorescence was proportional to the quantities present in the samples (theoretical slope = -3.32). We were able to establish optimal conditions for the quantitative study of several tumour markers by real-time PCR (Table 2).

Amplification and subsequent data analysis without post-amplification procedures such as gel electrophoresis could be achieved using a sequence detector (ABI Prism; Applied Biosystems). This will theoretically reduce the possibility of laboratory contamination and false positivity.

### Expression level of different markers in serous fluids

RT-PCR using CLDN1, CLDN4, CLDN 18, CEA, Ep-CAM, CK19, CK20, MUC1 and MUC16 specific primers were

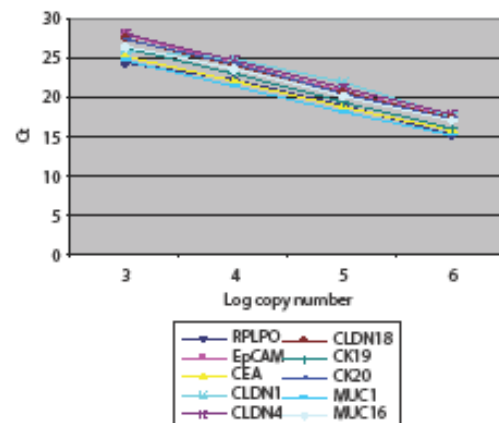


Figure 1. Standard curves obtained with plasmids encoding a panel of markers. Each curve was obtained with various plasmid concentrations. They were constructed using data from three experiments repeated by plotting the Ct (threshold cycle) value against the input cDNA concentration (serial dilutions of pDrive-vector) of samples.

Table 2. Parameters of the standard lines obtained for each tumour marker.

Plasmids	Slope	Intercept	$R^2$
RPLPO	-3.3	37.74	0.99
CLDN1	-3.31	37.66	0.99
CLDN4	-3.39	38.24	0.99
CLDN18	-3.39	37.75	0.99
CEA	-3.37	37.67	0.99
Ep-CAM	-3.12	36.48	0.99
CK19	-3.43	36.65	0.99
CK20	-3.4	37.67	0.99
MUC1	-3.16	34.14	0.99
MUC16	-3.09	35.69	0.99

performed with all of the 75 samples obtained in this study. Relative quantification using RPLPO as the reference gene was also applied for each sample. No significant difference for the relative RPLPO gene copy numbers was observed in patients with benign or malignant effusions ( $p > 0.05$ ). The RPLPO copy number was used to normalize the biomarker gene copy number in all patients (data not shown).

The expression of CLDN1, CLDN4, CEA, Ep-CAM, CK20 and MUC1 expressed in copy number is plotted in Figure 2.

We set up a threshold of positivity for each marker defined as the value of the copy number just below the highest one measured by real-time PCR in benign fluid controls for each marker (significant 95%). Fluids with higher copy numbers than these values were considered as malignant ( $p < 0.05$ ).

Our study demonstrates that the limit copy number was 95 725 for CLDN1, 28 908 for CLDN4, 33 191 for CEA, 43 755 for Ep-CAM, 81 475 for CK20, 56 367 for MUC1, 21 430 for CK20, 22 962 for MUC1 and 34 755 for MUC16.

The percentage of positive fluids for all markers examined, except CLDN18 and CK19, were significantly higher in the patients with malignant effusions than those with benign effusions ( $p < 0.05$ ) (Table 3).

The rate of patients positive for CLDN4 was 68% ( $p < 0.000001$ ) in all malignant effusions group, 74% ( $p < 0.000001$ ) in the gynaecological cancers group and 61% ( $p = 0.000006$ ) in the digestive cancers group, and for Ep-CAM 57% ( $p = 0.000042$ ), 70% ( $p = 0.000003$ ) and 43% ( $p = 0.004$ ), respectively (Table 3). Only four malignant effusions with negative markers were detected by cytology (Table 4).

The addition of the percentage of patients positive for CLDN4, Ep-CAM and CK20 molecular markers combined with the percentage of patients positive for cytology could enhance the detection of malignant effusions 48/56 (86%), gynaecological cancers 20/23 (87%) and 19/23 (83%) digestive cancers, respectively, as shown in Tables 4 and 5. Ten patients were cytologically negative but positive with molecular markers.

The rates of patients positive only in gynaecological cancer effusions were 43% ( $p = 0.004$ ) for CLDN1,

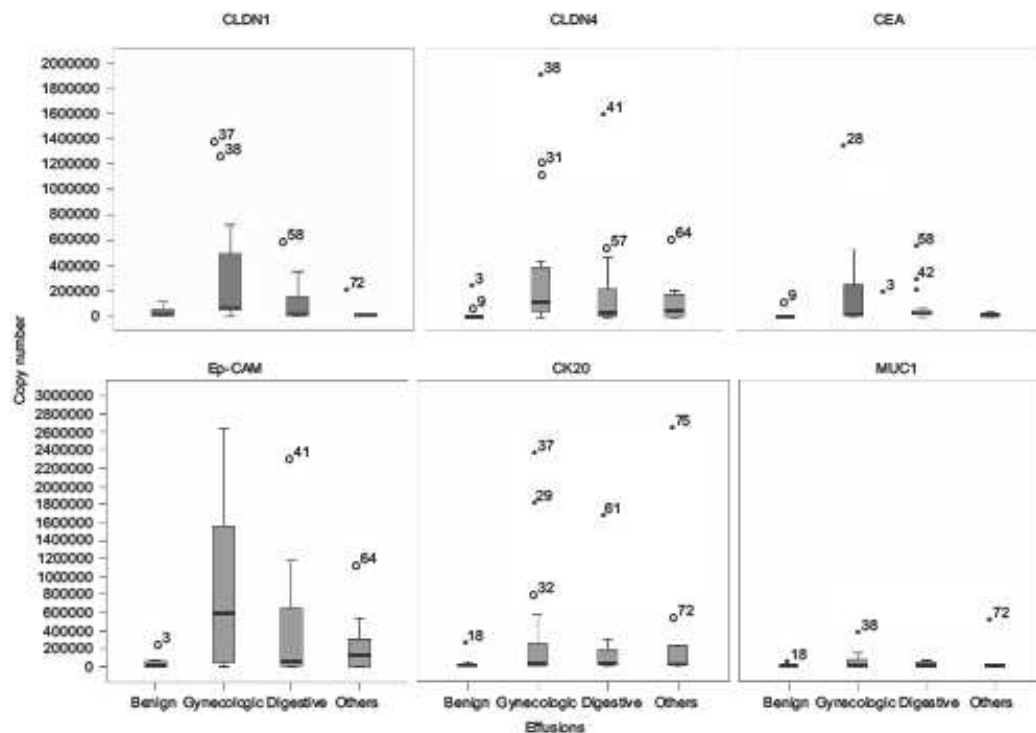


Figure 2. Box-plot showing the expression of CLDN1, CLDN4, CEA, Ep-CAM, CK20 and MUC1 by real-time PCR in serous fluids. The x-axis indicates the tissue origin of effusions, the y-axis indicates the copy number of each gene. Median value and interval limits are indicated for all the markers studied in each group of patients.



Table 3. Quantitative analysis of molecular marker expression by real-time RT-PCR in effusions

Diagnosis	Tumour cells		Number of positive fluids. (% of positive fluids)								
	Effusions (n)	negative (n)	p-Value								
			CLDN1	CLDN4	CLDN18	CEA	Ep-CAM	CK19	CK20	MUC1	MUC16
Benign	19	19	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)
Malignant	56	18	20 (36)	38 (68)	13 (23)	20 (36)	32 (57)	11 (20)	23 (41)	16 (29)	15 (27)
			0.01*	0.0000001*	0.08	0.01*	0.000042*	0.14	0.003*	0.03*	0.04*
Gynaecological	23	7	10 (43)	17 (74)	7 (30)	10 (43)	16 (70)	5 (22)	10 (43)	8 (35)	10 (43)
			0.004*	0.0000001*	0.03*	0.004*	0.000003*	0.13	0.004*	0.01*	0.004*
Breast	15	6	5 (33)	10 (67)	3 (20)	5 (33)	11 (73)	3 (20)	5 (33)	4 (27)	6 (40)
Ovary	8	1	5 (62)	7 (87)	4 (50)	5 (62)	5 (62)	2 (25)	5 (62)	4 (50)	4 (50)
Digestive	23	9	6 (26)	14 (61)	5 (22)	7 (30)	10 (43)	3 (13)	10 (43)	6 (26)	3 (13)
			0.07	0.00006*	0.13	0.03*	0.004*	0.4	0.004*	0.07	0.4
Colon	8	3	2 (25)	5 (62)	2 (25)	1 (12)	3 (37)	0 (0)	5 (62)	1 (12)	1 (12)
Pancreas	7	0	3 (43)	5 (71)	2 (28)	4 (57)	4 (57)	1 (14)	3 (43)	3 (43)	2 (28)
Liver	5	5	1 (20)	2 (40)	1 (20)	2 (40)	2 (40)	2 (40)	2 (40)	2 (40)	0 (0)
Small intestine	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stomach	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Gall bladder	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Others	10	2	4 (40)	7 (70)	1 (10)	3 (30)	6 (60)	3 (30)	3 (30)	2 (20)	2 (20)
			0.01*	0.00003*	0.6	0.07	0.0004*	0.07	0.07	0.23	0.23
Lung	4	0	0 (0)	4 (100)	0 (0)	1 (25)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Mesothelioma	3	0	2 (66)	1 (33)	1 (33)	1 (33)	1 (33)	2 (66)	2 (66)	2 (66)	2 (66)
Kidney	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prostate	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
Myeloid leukaemia	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

\*Limit copy number was the value just below the highest one measured in benign fluid controls for each marker by real-time PCR (significant 95%).

\*Significant 95%

35% ( $p=0.01$ ) for MUC1 and 43% ( $p=0.004$ ) for MUC16 (Table 3).

The quantitative analysis of molecular marker expression in control effusions is shown in Table 6.

Two patients with benign effusions (cardiac failure and hepatic cirrhosis) were positive for CLDN4, CEA and Ep-CAM markers and for CK20 and MUC1, respectively (Table 6). Although the copy number was moderately increased, it cannot be excluded in those patients who we did not have the opportunity to follow, who developed a cancer or who presented an overexpression of markers in a chronic inflammatory effusion.

#### Analysis of biomarker expression in cytologically negative malignant effusions

Among the 56 effusions diagnosed as malignant by histological analysis and patient clinical data, cytological examination was negative in 18 (32%). Markers demonstrated as able to discriminate significantly malignant versus benign effusions (all except CLDN18 and CK19), were measured in these fluids. At least one marker was found increased in 10 out 18 effusions (Table 5). CLDN4 and Ep-CAM and CK20 were the markers most frequently found to be increased.

## Discussion

To improve the detection of cancer cells in the effusions, very sensitive and specific new methods appear to be useful. The presence of cancer cells in effusions is a straightforward issue when a large number of overtly atypical cells are present but may pose more difficulty when these cells are few and less conspicuous. The detection of malignancy is hampered by the problem of differentiating malignant cells from reactive mesothelial cells. Therefore, it has been the practice to supplement morphological examination of cytological specimens with ancillary studies, of which immunocytochemistry has become the most frequently applied (Bedrossian 1998). These techniques provide new insight regarding the molecular characteristics of cancer cells in effusions, and therefore are of potential interest from a biological and therapeutic standpoint (Fetsch & Abati 2001). The results of previous studies have suggested that a panel of different molecular markers in the effusions can improve the diagnostic power of cytological analysis in detecting malignant cells (Brock et al. 2005, Mohanty & Dey 2003). Recent studies using RT-PCR suggested the usefulness of this method in the detection of cancer cells in effusions. The RT-PCR test for some markers such as mammaglobin

Table 4. Quantitative analysis of molecular marker expression by real-time PCR in cytologically positive effusions.

No.	Sex/age (years)	Diagnosis	CLDN1	CLDN4	CEA	Ep-CAM	CK20	MUC1
			95725 <sup>a</sup>	28908 <sup>a</sup>	48755 <sup>a</sup>	81475 <sup>a</sup>	21430 <sup>a</sup>	22962 <sup>a</sup>
1	F/86	Breast	+	—	—	+	—	—
2	F/75	Breast	—	+	—	+	—	—
3	F/79	Breast	—	+	—	+	—	+
4	F/54	Breast	—	+	—	+	—	—
5	F/58	Breast	+	+	+	+	+	—
6	F/58	Breast	+	+	+	+	+	—
7	F/46	Breast	+	+	+	—	+	+
8	F/61	Breast	—	+	+	+	+	—
9	F/56	Breast	—	+	—	+	—	+
10	F/73	Ovary	+	+	+	+	+	+
11	F/56	Ovary	+	+	+	+	+	—
12	F/73	Ovary	+	+	+	+	+	+
13	F/82	Ovary	+	+	+	+	+	+
14	F/68	Ovary	+	+	+	+	+	+
15	F/88	Ovary	—	+	—	—	—	—
16	F/59	Ovary	—	—	—	—	—	—
17	F/85	Pancreas	+	+	—	+	—	+
18	F/64	Pancreas	+	+	+	+	+	—
19	F/69	Pancreas	—	—	—	—	—	—
20	M/57	Pancreas	—	—	—	—	—	—
21	M/56	Pancreas	—	+	+	—	+	—
22	F/76	Pancreas	+	+	+	+	+	+
23	M/66	Pancreas	—	+	+	+	—	+
24	M/67	Colon	+	+	+	+	+	—
25	F/52	Colon	—	—	—	—	—	—
26	F/61	Colon	—	—	—	+	—	—
27	M/66	Colon	—	+	—	+	+	+
28	F/85	Colon	—	+	—	—	+	—
29	F/56	Stomach	—	+	—	+	—	—
30	M/73	Gall bladder	—	+	—	—	—	—
31	M/69	Lung	—	+	+	+	—	—
32	F/78	Lung	—	+	—	+	—	—
33	M/59	Lung	—	+	—	+	—	—
34	M/56	Lung	—	+	—	+	—	—
35	M/60	Mesothelioma	—	+	—	+	—	—
36	F/60	Mesothelioma	+	—	—	—	+	+
37	M/72	Mesothelioma	+	—	+	—	+	+
38	M/77	Prostate	+	+	+	+	+	—

<sup>a</sup>Limit copy number was the value just below the highest one measured in benign fluid controls for each marker by real-time PCR (significant 95%).

was found to be of higher sensitivity than routine cytology in the detection of carcinoma cells (Grunewald et al. 2002). The expression of the glycoprotein genes MUC1 and MUC5AC was found to be a discriminator between malignant and benign effusions using quantitative RT-PCR (Yu et al. 2001).

In the present study, our aim was to demonstrate that the quantitative expression analysis of several molecular markers is a more sensitive and rapid method and that it could improve the yield of cytological analysis for cancer diagnosis in serous effusions. We have developed a real-time RT-PCR technique to quantify the mRNA copy numbers of three members of the claudin family (CLDN1, -4 and -18) and we compared them with a panel of usual

cancer-specific molecular markers in a large number of benign and malignant serous fluids using plasmid dilutions of cloned PCR fragments to obtain more reliable and reproducible quantification of these marker transcripts.

Even if these markers have been studied at the mRNA level, one could expect them to be functional at the protein level according to the numerous publications that have studied them by immunocytochemistry in tissues or serous effusions (Kulka et al. 2009, Tokes et al. 2005, Monte et al. 1987, Facchetti et al. 2007). Our results indicate that the markers studied are highly expressed in serous effusions of tumoral origins except CLDN18 and CK19, which were not significantly increased compared with benign fluids.

**Table 5.** Quantitative analysis of molecular marker expression by real-time PCR in cytologically negative malignant effusions.

N°	Age (years)/sex	Diagnosis	CLDN1	CLDN4	CEA	Ep-CAM	CK20	MUC1
			95725 <sup>a</sup>	28908 <sup>a</sup>	43755 <sup>a</sup>	81475 <sup>a</sup>	21430 <sup>a</sup>	22962 <sup>a</sup>
1	42/F	Breast	–	–	–	–	–	–
2	49/F	Breast	–	+	–	+	–	–
3	70/F	Breast	–	–	–	–	–	–
4	63/F	Breast	+	+	+	+	+	+
5	83/F	Breast	–	–	–	–	–	–
6	83/F	Breast	–	–	–	+	–	–
7	90/F	Ovary	–	+	–	–	–	–
8	65/M	Colon	–	+	–	–	–	–
9	80/M	Colon	+	+	–	–	+	–
10	82/F	Colon	–	–	–	–	+	–
11	77/M	Liver	–	–	–	–	–	–
12	72/M	Liver	–	–	–	–	–	–
13	67/M	Liver	–	+	+	+	+	+
14	58/M	Liver	–	–	–	–	–	–
15	78/M	Liver	+	+	+	+	+	+
16	79/F	Small intestine	–	–	–	–	–	–
17	81/M	Kidney	–	–	–	–	–	–
18	49/M	Myeloid leukaemia	+	+	–	–	–	–

<sup>a</sup>Limit copy number was the value just below the highest one measured in benign fluid controls for each marker by real-time PCR (significant 95%).**Table 6.** Quantitative analysis of molecular marker expression by real-time PCR in control effusions.

No.	Sex/age (years)	Diagnosis	CLDN1	CLDN4	CEA	Ep-CAM	CK20	MUC1
			95725 <sup>a</sup>	28908 <sup>a</sup>	43755 <sup>a</sup>	81475 <sup>a</sup>	21430 <sup>a</sup>	22962 <sup>a</sup>
1	F/78	Cardiac failure	–	–	–	–	–	–
2	M/78	Cardiac failure	–	–	–	–	–	–
3	M/54	Cardiac failure	–	+	+	+	–	–
4	F/90	Cardiac failure	–	–	–	–	–	–
5	M/73	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
6	F/86	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
7	M/48	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
8	F/76	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
9	M/75	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
10	F/46	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
11	M/54	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
12	M/64	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
13	M/60	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
14	M/86	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
15	F/46	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
16	M/56	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
17	F/82	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–
18	M/57	Hepatic cirrhosis	+	–	–	–	+	+
19	M/61	Hepatic cirrhosis	–	–	–	–	–	–

<sup>a</sup>Limit copy number was the value just below the highest one measured in benign fluid controls for each marker by real-time PCR (significant 95%).

Only CLDN4 and Ep-CAM were found increased in all types of cancer tested and appeared to be the most discriminant markers. CLDN4 appeared as the most sensitive and discriminant markers for cancer diagnosis. The combined use of CLDN4 and/or Ep-CAM and/or CK20 and cytology increased the efficiency of the diagnosis of malignant effusions from 68% to 86% of patients. CLDN1, MUC1 and MUC16 were increased only in gynaecological cancers. In cytologically negative malignant effusions, at

least one molecular marker was found increased in 50% of patients and CLDN4 was the most sensitive. CLDN4 exhibited several advantages compared with other markers studied for optimal specificity and sensitivity (Facchetti et al. 2007). Many explanations can be expected for marker expression in cytologically negative effusions. First, the malignant cells could be too few to be visualized by microscopy, their morphological abnormalities are not characteristic enough to set up the diagnosis of

malignancy and the disturbance of gene transcription can explain why molecular markers can appear very early in the malignant process. False-positive results can be excluded because the analysis was repeated two times with a conserved copy number very increased.

The histological type of the primary tumours was very heterogeneous and without common features concerning tumour size and grade in these 18 cases. Unfortunately, we could not analyse by immunochemistry the original tumour tissues concerning their CLDN4 and Ep-CAM expression.

In conclusion, our study indicates that RT-PCR quantification of different markers in serous effusions is a valuable tool for the detection of free cancer cells in the fluids. Claudin family genes appeared of great interest as CLDN4 was identified as the most sensitive and discriminant marker for cancer diagnosis and CLDN1 was increased only in gynaecological cancers. From quantification of molecular markers in cytologically negative malignant effusions, CLDN4 could be interestingly associated with Ep-CAM and CK20 in a RT-PCR multiplex setting to improve the efficiency of diagnosis.

Our study demonstrated that the ability to malignancy in effusion specimens from cancer patients can be markedly improved by the use of molecular techniques such as quantitative real-time RT-PCR in addition to the standard cytopathological examination. If these molecular bioassays could improve the early diagnosis of cancer and/or the ability to predict a metastatic development from primary tumours this would be very useful in the future.

## Acknowledgements

We thank C. Ruesch MD, D. Mille MD, B. Hacquard MD, S. Kawaye MD and W. Mazloum for providing serous effusions, M. Rehailia for statistical analysis, A. Buchmuller and F. Rancoon from DRCC for methodology assistance, F. Duplat for technical assistance and C. Moulin for secretary assistance. This work was supported by a grant from la Ligue Contre le Cancer, Comité de la Loire and the Clinical Research Direction of University Hospital Center.

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

Backus J, Laughlin T, Wang Y, Belly R, White R, Baden J, Justus Min C, Mannie A, Tafra L, Atkins D, Verbanac KM. (2005). Identification

- and characterization of optimal gene expression markers for detection of breast cancer metastasis. *J Mol Diagn* 7:327–38.
- Bedrossian CW. (1998). Diagnostic problems in serous effusions. *Diagn Cytopathol* 19:131–7.
- Brock MV, Hooker CM, Yung R, Guo M, Han Y, Ames SE, Chang D, Yang SC, Mason D, Sussman M, Baylin SB, Herman JG. (2005). Can we improve the cytologic examination of malignant pleural effusions using molecular analysis? *Ann Thorac Surg* 80:1241–7.
- Cheung ST, Leung KL, Ip YC, Chen X, Fong DY, Ng IO, Fan ST, So S. (2006). Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 11:551–6.
- Facchetti E, Lonardi S, Gentili F, Bercich L, Falchetti M, Tardanico R, Baronzelli C, Lucini L, Santin A, Murer B. (2007). Claudin 4 identifies a wide spectrum of epithelial neoplasms and represents a very useful marker for carcinoma versus mesothelioma diagnosis in pleural and peritoneal biopsies and effusions. *Virchows Arch* 451:669–80.
- Fetsch PA, Abati A. (2001). Immunocytochemistry in effusion cytology: a contemporary review. *Cancer* 93:293–308.
- Grunewald K, Haun M, Fiegl M, Urbanek M, Muller-Holtner E, Massoner A, Riha K, Probst A, Marth C, Gastl G. (2002). Mammaglobin expression in gynecologic malignancies and malignant effusions detected by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Lab Invest* 82:1147–53.
- Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. (2006). The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 6:186.
- Hoebel T, Macek R, Mundigl O, Swisshelm K, Kubbies M. (2002). Expression and targeting of the tight junction protein CLDN1 in CLDN1-negative human breast tumor cells. *J Cell Physiol* 191:60–8.
- Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA. (2008). Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 118:619–28.
- Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. (2000). Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 60:5281–7.
- Johnson AH, Frierson HE, Zaika A, Powell SM, Roche J, Crowe S, Moskaluk CA, El-Rifai W. (2006). Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis. *Am J Pathol* 167:577–84.
- Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. (2003). Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 22:2021–33.
- Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S. (2004). Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytotoxicity of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* 164:1627–33.
- Kramer F, White K, Kubbies M, Swisshelm K, Weber BH. (2000). Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum Genet* 107:249–56.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek I, Blasig IE. (2006). Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 1778:631–45.
- Kulka J, Szasz AM, Nemeth Z, Madaras L, Schaff Z, Molnar IA, Tokes AM. (2009). Expression of tight junction protein claudin-4 in Basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res* 15:59–64.
- Lee MJ, Lee HS, Kim WH, Choi Y, Yang M. (2003). Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Mod Pathol* 16:403–10.
- Lim TS, Vedula SR, Kausalya PJ, Hunziker W, Lim CT. (2008). Single-molecular-level study of claudin-1-mediated adhesion. *Langmuir* 24:490–5.
- Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. (2001). Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res* 61:7878–81.
- Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM. (2001). Claudin-4: a new target



- for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterology* 121:678-84.
- Mohanty SK, Dey P. (2008). Serous effusions: diagnosis of malignancy beyond cytomorphology. An analytic review. *Postgrad Med J* 79:569-74.
- Monte SA, Elhya H, Lang WR. (1987). Positive effusion cytology as the initial presentation of malignancy. *Acta Cytol* 31:448-52.
- Morin PJ. (2005). Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 65:9803-8.
- Oki E, Maehara Y, Tokunaga E, Shibahara K, Hasuda S, Kakeji Y, Sugimachi K. (2002). Detection of disseminated cancer cells in bone marrow of gastric cancer using real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer Lett* 188:191-8.
- Passebosch-Faure K, Li G, Lambert C, Cottier M, Gentil-Perret A, Fournel P, Perol M, Genin C. (2005). Evaluation of a panel of molecular markers for the diagnosis of malignant serous effusions. *Clin Cancer Res* 11:6862-7.
- Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alo PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. (2003). Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res* 9:2567-75.
- Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. (2005). Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 18:511-18.
- Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W. (2006). Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J Pathol* 208:633-42.
- Sheehan GM, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP, Jr., Ross JS. (2007). Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Hum Pathol* 38:564-9.
- Spring K. (1998) Routes and mechanism of fluid transport by epithelia. *Annu Rev Physiol* 60:105-19.
- Swisselhelm K, Macek R, Kubbies M. (2005). Role of claudins in tumorigenesis. *Adv Drug Deliv Rev* 57:919-28.
- Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K, Schaff Z. (2006). Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* 7:R296-305.
- Tsukita S, Furuse M. (2000). Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149:13-16.
- Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV. (2003). The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 163:2139-48.
- Yu CJ, Shew JY, Liaw YS, Kuo SH, Luh KT, Yang PC. (2001). Application of mucin quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction in assisting the diagnosis of malignant pleural effusion. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1312-18.
- Zhang KH, Cao F, Fu QB, Zhu JQ, Chen J, Lv NH. (2007). Detection of mRNAs of GA733 genes by RT-PCR in exfoliated cells of pleural and peritoneal effusions and its clinical values. *Intern Med* 46:1489-94.

## Conclusion et perspectives

Les résultats de précédentes études ont montré qu'un panel de différents marqueurs moléculaires dans les épanchements peut améliorer la puissance diagnostique de l'analyse cytologique dans la détection des cellules malignes (*Brock MV 2005 ; Mohanty SK 2003*). Des études récentes utilisant la RT-PCR ont suggéré l'intérêt de cette méthode dans la détection de cellules cancéreuses dans les épanchements. Ces études ont détecté certains marqueurs tels que la mammaglobine, le CD44, la métalloprotéinase de la matrice, le MUC1 et d'autres membres des mucines (*Yu CJ 2001 ; Davidson B 2001 ; Sakaguchi M 1999*) avec une sensibilité plus élevée que la cytologie conventionnelle pour la détection de cellules d'adénocarcinome (*Grünewald K 2002*).

Dans la présente étude, notre objectif était de démontrer que la quantification de l'expression de plusieurs marqueurs moléculaires est une méthode plus sensible et rapide et que l'on pourrait améliorer le rendement de l'analyse cytologique pour le diagnostic de cancer dans les épanchements séreux.

Nous avons développé la technique de RT-PCR quantitative en temps réel pour permettre de quantifier l'ARNm de trois membres de la famille des Claudines (CLDN1, 4 et 18) et nous les avons comparés à l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), la molécule d'adhésion des cellules épithéliales (Ep-CAM), deux membres de la famille des cytokératines (CK19, CK20) et deux membres de la famille de la mucine (MUC1, MUC16) dans 75 liquides séreux bénins et malins en utilisant des dilutions plasmidiques de fragments de PCR clonés pour obtenir une quantification plus fiable et reproductible de ces marqueurs transcrits. Même si ces marqueurs ont été étudiés au niveau de l'ARNm, on pourrait s'attendre à ce qu'ils soient fonctionnels au niveau des protéines selon les nombreuses publications qui les ont étudiées par immunocytochimie dans les tissus ou les épanchements séreux (*Kulka J 2009 ; Tokes AM 2005 ; Monte SA 1987 ; Facchetti F 2007*). Nos résultats indiquent que les marqueurs étudiés sont fortement exprimés dans les épanchements séreux d'origine tumorale sauf CLDN18 et CK19 qui n'ont pas été significativement augmentés par rapport aux fluides bénins. Seuls CLDN4 et Ep-CAM ont été trouvés augmentés dans tous les types de cancer testés et semblent les marqueurs les plus discriminants. CLDN4 est apparu comme le marqueur le plus sensible et discriminant pour le diagnostic du cancer. L'association avec Ep-CAM a augmenté

la puissance de diagnostic à 75 % des cas. CLDN1, MUC1 et MUC16 ne sont augmentés que dans les cancers gynécologiques.

Dans les épanchements malins avec une cytologie négative, au moins un marqueur moléculaire a été trouvé augmenté dans la moitié des cas et CLDN4 était le plus sensible. La claudine 4 présentait plusieurs avantages par rapport à d'autres marqueurs étudiés pour la spécificité et la sensibilité optimale (*Facchetti F 2007*).

En conclusion, notre étude indique que la RT-PCR quantitative de différents marqueurs dans les épanchements séreux est un outil précieux pour la détection de cellules cancéreuses libres dans les fluides. La famille Claudine paraît d'un grand intérêt en considérant que la CLDN4 a été trouvée le marqueur le plus sensible et discriminant pour le diagnostic du cancer et que CLDN1 a été augmenté seulement dans les cancers gynécologiques. Pour améliorer sa puissance diagnostique, la quantification des marqueurs moléculaires dans les épanchements malins cytologiquement négatifs pourrait être réalisée en associant la CLDN4 et l'Ep-CAM dans un multiplex. La détectabilité de la malignité dans les épanchements de patients atteints de cancer peut être nettement améliorée par l'utilisation des techniques moléculaires en plus de l'examen standard de cytopathologie.

Enfin il serait intéressant d'évaluer ces marqueurs en termes de contrôle pronostique pour suivre les patients et l'efficacité des traitements administrés

## *Le deuxième article :*

### **Introduction**

La détection et l'identification des cellules malignes primitives ou métastatiques représentent les objectifs principaux de l'examen cytologique. Il est nécessaire de développer de nouveaux outils diagnostiques qui permettent d'améliorer la détection précoce.

Actuellement la détection de cellules tumorales circulantes dans les fluides corporels (sang périphérique ; urine ; osseuse moelle ou même épanchements inflammatoires...) pourrait permettre un diagnostic précoce avec des implications cliniques pour les patients et le suivi du traitement.

La présence éventuelle des marqueurs tumoraux dans le plasma ou le sérum simplifierait beaucoup le diagnostic. Beaucoup d'intérêt a été porté sur les applications du dosage des acides nucléiques et de leur utilité comme biomarqueurs.

La technique de PCR quantitative en temps réel semble la plus prometteuse en augmentant la spécificité et la sensibilité de détection des transcripts et elle a permis de détecter et de quantifier très petites quantités d'acides nucléiques dérivés de tumeurs. Cela a conduit à l'utilisation de l'ADN et de l'ARN messenger comme marqueurs dans le sang pour la détection précoce du cancer, pour le diagnostic et le suivi des patients.

Le but de notre étude a été d'identifier la présence et la stabilité de l'ARNm dans le sérum, et d'évaluer s'il pourrait constituer un marqueur tumoral permettant de discriminer les patientes atteintes de cancer du sein et des sujets normaux.

Nous avons analysé l'expression de CLDN4 au niveau de l'ARNm comme biomarqueur dans les sérums des patients par RT-PCR quantitative.

La stabilité de l'ARNm a été appréciée par un gène de ménage (RPLPO).

## **Circulating Claudin-4 mRNA in serum is a new very sensitive molecular marker for breast cancer.**

**Fauzia Mohamed<sup>1</sup>, Abir Khaddage<sup>2</sup>, Nadine Vincent<sup>1</sup>, Pierre Seffert<sup>3</sup>, Delphine Frère<sup>4</sup>, Michel Peoc'h<sup>2</sup>, Stéphane Paul<sup>1</sup> and Christian Genin<sup>1</sup>**

Department of <sup>1</sup>Immunology, <sup>2</sup>Pathology, <sup>3</sup>Gynecology and <sup>4</sup>Nuclear Medicine, University Hospital Center, Saint-Etienne, France.

**Short title:** Serum CLDN4 is a new very sensitive marker for breast cancer

**Keywords:** serum claudin 4, breast cancer, quantitative RT-PCR, predictive biomarkers

**Article category:** Research article – Early detection and diagnosis

### **Statement of Translational Relevance**

This study analysed the presence of circulating claudin 4 (CLDN4) mRNA in serum samples of 188 patients with recently diagnosed breast cancer and 30 matched healthy women to evaluate whether the rate of CLDN4 mRNA can be used as a tumor marker to discriminate breast cancer and healthy women. CLDN4 mRNA was measured using real-time quantitative RT-PCR and was compared with CA 15-3 protein level measured using immunoassay. CLDN4 was found significantly increased in serum of 75/118 (64 %) patients with breast cancer versus 6 % for CA 15-3. The expression of claudin 4 was not correlated with clinicopathology parameters.

Our results suggested that the rate of CLDN4 mRNA gives the opportunity to predict breast cancer before pathological diagnosis in a large majority of patients and can avoid other invasive techniques as cytological puncture with fine needle aspiration or microbiopsy and directly proceed to a tumorectomy.

**Grant sponsors:** This work was supported by a grant from la Ligue contre le Cancer, Comité Loire and the Clinical Research Direction of University Hospital Center.

**Correspondence to:** C. GENIN, Department of Immunology, CHU de Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 2 France. Phone: 33-4-77-82-83-79; Fax: 33-4-77-82-84-93; E-mail: Christian.Genin@univ-st-etienne.fr.

## **ABSTRACT:**

The first aim of this study was to analyse the presence of circulating Claudin 4 (CLDN4) mRNA in serum and to evaluate whether the rate of CLDN4 mRNA can be used as a tumor marker to discriminate between breast cancer patients and healthy women. The second aim was to compare CLDN4 mRNA measured using real-time quantitative RT-PCR with Carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) protein level measured using immunoassay as biomarker for the diagnosis of breast cancer. The present study included serum samples from 118 patients with recently diagnosed breast cancer and 30 matched healthy women. The number of copies of CLDN4 mRNA and CA-15-3 protein level were analysed and the percentage of patients with increased marker level were compared. The quality and the stability of mRNA evaluated using the housekeeping gene RPLPO in all serum sampling studied were confirmed ( $p>0.05$ ). The expression level of CLDN4 mRNA was found significantly increased in serum of 75/118 (64%) patients with breast cancer from the threshold calculated in healthy women ( $p=0.00002$ ) versus 6 % for CA 15-3. The expression of claudin-4 was only correlated with age of the patients but not with histological type, tumor size, nodal status, tumor grade, and status of estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors and human epidermal growth factor receptor 2 (Her2). Our results show that the expression of CLDN4 mRNA by real-time quantitative PCR give the opportunity to predict breast cancer before pathological diagnosis in a large majority of patients.

## INTRODUCTION:

Despite advances in therapeutic strategies, breast cancer is the main cause of women death in Europe. Most time, breast tumor is suspected by the patient herself or by a systematic medical examination and early detection, essentially using ultrasonography or/and x ray imaging screening. At the present time, cytological punction with fine needle aspiration or microbiopsy with radiolocation can be performed to improve cancer diagnosis but they are rather invasive and not always successful. In future, it would be beneficial to patient that very small or infraclinical tumors could be detected. However, pathological analysis is the gold standard technique to confirm the diagnosis of cancer and to determine the histological type and grade.

The carbohydrate antigen 15-3 (CA15-3) is widely used as tumor marker for breast cancer. Its level in serum increases at the metastatic phase in 50-80% breast cancer patients <sup>1, 2</sup>. Its measurement in human serum is an important step in early detection of metastases but currently it is not recommended for screening or diagnosis of breast cancer and its main application is in monitoring response to treatment in women with metastatic breast cancer.

The identification of gene expression patterns has become a key issue in understanding the biological diversity of breast tumors, leading to new hopes for diagnosis, prognosis, and future treatments. Moreover, the identification of accurate biomarkers may provide very useful informations for early breast cancer suspicion, and can constitute targets for cancer immunotherapy <sup>3</sup>.

Real-time RT-PCR is now the recommended method for quantitative gene expression analysis. The use of real-time PCR requires accurate controls in order to be routinely used in clinical samples, particularly for low level mRNA targets. The regular quality controls will be necessary to ensure the reliability of real-time PCR assays. An essential step is the selection of good reference genes for normalization of the method <sup>4</sup>. The reference gene (housekeeping genes) is selected specifically for its properties of exhibiting stable expression between samples. The importance of the stability of reference gene and the normalization is one of RT-PCR most difficult tasks <sup>5, 6</sup>.

Claudin 4 (CLDN4), a tight junction protein, is overexpressed in breast tumour cells compared to normal epithelial cells, which generally corresponds to a loss in polarity and in barrier function <sup>7, 8</sup>. It exhibits several advantages compared with other biomarkers studied for optimal specificity and sensitivity in immunohistochemical analysis. CLDN4 is frequently up-

regulated in ovarian, endometrial, renal, pancreatic, prostate and breast tumors <sup>9-20</sup>. A study carried out by immunochemistry on a large patient cohort (n=184) found that claudin-4 protein was expressed in 92 % of the breast carcinomas examined and had no association with tumor grade, type, status of estrogen (ER) or progesterone receptor (PR) <sup>21</sup>. An other study including tissue microarray found that the expression of claudin-4 was positively correlated with tumor grade and negatively with ER and that an increased claudin-4 protein expression was associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer <sup>7</sup>.

Real-time RT-PCR and serial analysis of gene expression (SAGE) have been previously used to study the expression of Claudin gene family in normal and neoplastic tissues <sup>11, 15, 19, 22, 23</sup> especially in breast tissues <sup>7, 24-26</sup>.

However, no previous study on claudin-4 expression in breast cancer has been performed in the serum of patients.

In the present study, our aims were:

- to evaluate the accuracy of quantitative analyses of human acidic ribosomal phosphorprotein PO (RPLPO) as reliable reference gene using real-time RT-PCR in serum.
- to identify the presence of CLDN4 mRNA using quantitative real-time RT-PCR in serum of women with breast cancer newly diagnosed and to evaluate whether the amounts of its circulating mRNA could discriminate breast cancer patients and healthy women and if it can be considered as an interesting tumor marker.

We demonstrated in a large cohort that CLDN4 mRNA is detected in 64 % of serum and only in 6 % for CA 15-3 carbohydrate antigen in patients with breast cancer.



## PATIENTS AND METHODS

***Patients:*** Serum samples from 118 women with breast cancer, collected at the time of tumorectomy, ranged between 33 and 86 years in the Department of Gynecology, CHU of Saint Etienne and matched 30 serum samples from healthy women as controls in the Auvergne-Loire Regional Blood Bank, respectively.

The serum samples were prepared by centrifugation of peripheral blood at 300 g for 15 min, and then immediately frozen at -80°C until processing.

This study was conducted after Human Experimentation Review by the relevant committee.

### ***Selection of primers:***

The primers were designed using the Primer Express 3.0 software (Applied Biosystem, Foster City, CA). The sequences of the primers and amplicon are summarised in Table 1.

### ***RNA extraction of serum:***

RNA was extracted from 700 µL of serum by using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) accordingly to the manufacturer instructions. Purified RNA concentrations were measured using a Nanodrop 1000 spectrophotometer and stored at -80°C before use.

RNA quality was estimated by RT-PCR of transcripts for ribosomal protein (RPLPO). Negative controls in which RNA entry has been omitted were used.

### ***Reverse transcription:***

Reverse transcription was conducted with the Omniscript RT Kit for RT-PCR (Qiagen) accordingly to the manufacturer instructions. RT-PCR were performed with 0.5 µg of total RNA. The obtained cDNA were then stored at -20 °C before use.

### ***Quantitative real-time PCR:***

PCR reactions were performed with the ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Amplification PCR were performed in a total volume of 25 µL comprising 5 µL of cDNA template diluted 1/10 and 12.5 µL Master Mix Syber Green PCR (Applied Biosystem) and 2 µL primers at 200 nM. The program included a PCR initial denaturation of 10 min at 95 °C followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. Each experiment included witnesses Non TemplateControl (NTC) for which the cDNA was replaced by pure water. All

PCR reactions were performed in duplicate or triplicate. Each pair of primer was tested by a dissociation curve as a result of PCR. The presence of a single peak for each sample confirmed the specificity of the PCR.

### ***Preparation of the standard curve***

The RPLPO and CLDN4 plasmids were obtained by cloning the amplified DNA sequence in the vector pDrive (3850 bp). The plasmids were verified by sequencing. The RPLPO reference plasmid was used to standardize and to quantify the number of RPLPO copies compared to the concentration of plasmids allowing to define a standard range of RPLPO gene (897ng/μL). For the standard range, a series of dilutions from  $10^6$  to 500 copies was used. Four NTC were also included where DNA has been replaced by pure water.

### ***Standard curve***

RPLPO has been chosen as housekeeping gene in this study. A standard curve was calculated using linear regression analysis. The standard curve showed a linear relationship between the values of Ct and the logarithm of the initial number of plasmid copy number. The amount of product in a sample was determined by interpolation from a standard curve of Ct values generated by the serial dilution of plasmid ranging from  $10^6$  to 500 copies of each plasmid. Amplification and subsequent data analysis without post-amplification procedures such as gel electrophoresis could be achieved using a sequence detector (ABI Prism, Applied Biosystems). This theoretically reduce the possibility of laboratory contamination and false positivity.

The results were expressed as n-fold differences in target gene expression relative to RPLPO as reference gene between the breast cancer patients and normal control. It was determined as follows: Ratio = samples ratio  $\left( \frac{\text{copy number gene cible}}{\text{copy number reference gene}} \right) / \text{subject's ratio} \left( \frac{\text{copy number gene cible}}{\text{copy number reference gene}} \right)$ . A ratio of 10-fold was measured for CLDN4 in the serum of patients compared to normal controls.

### ***Statistical analysis***

The comparison of RPLPO mRNA level among all the samples examined was performed using non-parametric Kruskal-Wallis test (Statistica).

Considering that we defined a positivity threshold in copy number for CLDN4, values measured by quantitative RT-PCR were expressed as positive or negative. CLDN4 mRNA values studied in groups of patients with breast cancer and healthy women were compared using the  $\chi^2$  test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### **Quality of serum mRNA and normalization of the measurement:**

The quality of serum mRNA from the 118 patients with breast cancer and the 30 healthy women was studied. The mRNA integrity was measured using the NanoDrop® Spectrophotometer based on the absorbance ratio at 260 nm/280 nm (data not shown).

To measure quantitatively the gene expression in clinical specimens, a normalization was necessary to correct the data due to non-biological variations introduced during sample processing such as the quality of RNA or PCR efficiency. The expression of three different genes: beta-actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the ribosomal protein (RPLPO) frequently used as housekeeping genes were measured by quantitative RT-PCR in 12 samples of patients serum to evaluate the most stable and homogeneous gene.

We have observed that RPLPO is the most homogeneous and stable of the three genes studied to normalize the gene expression in serum of healthy women and of patients (data not shown). Subsequently, the level of RPLPO was studied in all sera samples. No significant difference was found for mRNA obtained from serum of healthy women and from patients ( $p = 0.85$ ).

The results were reproducible over time and with different preparations of total RNA for each patient.

Circulating mRNA is stable enough to be amplified. So, it's appeared possible to study other genes as biomarkers for cancer detection.

### **Real-time PCR standard curve of CLDN4 mRNA**

Quantitative real-time PCR allowed sensitive and specific detection of CLDN4 mRNA in the serum of patients. Real-time PCR was applied to determine the absolute number of CLDN4 mRNA in the serum samples from healthy women and patients with breast cancer. The assay sensitivity has been determined as 500 copies in serum samples. Standard curves were obtained with plasmids encoding RPLPO and CLDN4 ( $N=3$ ) and was constructed by plotting the Ct (threshold cycle) values against the input cDNA concentrations (serial dilutions of pDrive-vector) of each sample.

Using a standard curve for the gene of interest, a relative copy number value could be determined for all patients. The calculated threshold cycle (Ct) reflects the quantity and the quality of the RNA samples with lower Ct values reflecting a greater amount of molecules<sup>27</sup>. The Ct value decreased linearly with increasing gene quantity from 500 to 1 million copies.

For CLDN4 mRNA, the values for serum samples were calculated with reference to standard curve (Fig.1 and Table 2). The real-time PCR was performed by dilutions of plasmids for RPLPO and CLDN4. The parameters of calibration lines obtained indicated that the PCR conditions were very efficient ( $R^2 = 0.99$ ) and the measured fluorescence was proportional to the quantities present in the serum samples (theoretical slope = -3.32). Optimal conditions for the quantitative study of CLDN4 as tumor marker by real-time PCR were established (Table 2).

### **Clinicopathological parameters and CA15-3 measurements**

The clinical and pathological characteristics of patients with breast cancer are shown in Table 4. CA15-3 carbohydrate was initially measured by immunoassay in the serum of the 118 patients with breast cancer and in of 30 healthy women. The cut-off limit was established at 30 u/ml. The distribution of CA15-3 content was as follows: 7 out of 118 (6%) samples were positive in patients and 0 in control samples (Table 3).

### **CLDN4 expression in serum samples**

Real-time RT- PCR using CLDN4 specific primers were performed in all 118 serum samples obtained in this study. Relative quantification using RPLPO as the reference gene was applied for each sample.

The median value of the copy numbers of CLDN4 were significantly higher in serum of patients with breast cancer than in those of healthy women control (median 4150 (191-42984) and 623 (58-3041) respectively) (Table 3).

The threshold of positivity for CLDN4 defined as the value of the copy number just below the highest one measured by real time PCR in serum of healthy women control was determined as 2774 copies (significant 95 %). Serum with higher copy numbers than these values were considered as significantly increased.

CLDN4 mRNA was significantly up-regulated in breast cancer patients (64%) compared to healthy women control (3%,  $p = 0.00002$ ).

The variable of the 43 patients with negative and the 75 with positive CLDN4 were analyzed using Kruskal-Wallis test or  $\chi^2$  test. For age the difference was significant ( $p = 0.047$ ). For histological type ( $p = 0.073$ ), tumor size ( $p = 0.62$ ) nodal status ( $p = 0.99$ ), tumor grade ( $p = 0.57$ ), ER status ( $p = 0.63$ ), PR status ( $p = 0.75$ ), Her2 status ( $p = 0.75$ ), the differences were not found significant (Table 4).

## DISCUSSION

Free circulating mRNA in serum or plasma appears as a very interesting biomarker for early detecting cancer, requiring only a limited blood sample. It has opened new possibilities to monitor non-invasive cancer, and has given the opportunity to supplant conventional tools for infraclinical or very small tumors diagnosis <sup>28</sup>. The presence of circulating RNA was considered of low probability because RNA is more labile than DNA and ribonucleases have been found in blood. RNA may probably be complexed to lipids, proteins, lipoproteins, or phospholipids <sup>29</sup>, bound to DNA in nucleosomes <sup>30</sup> or protected within apoptotic bodies <sup>31</sup> or other vesicular structures. Previous studies have confirmed the stability of circulating mRNA in serum of cancer patients by their association with small particles which could protect them from degradation by RNases <sup>32, 33</sup>. Using RT-PCR, mRNA has been described as markers for identifying patients with colorectal, lung, thyroid, melanoma and breast cancers <sup>34-38</sup>. Its wide applicability is susceptible to give it a large clinical impact in the near future.

RT-PCR has become the standard method for mRNA quantification. This technique involves several critical steps such as RNA extraction, cDNA synthesis, quantitative PCR and analysis, which all can be source of variation. In order to obtain meaningful results, normalization is very important to correct sample variations.

The present study evaluated the accuracy of quantitative analyses of Claudin 4 mRNA expression in breast cancer using real time RT-PCR and RPLPO as reference that was demonstrated as the most stable gene <sup>39-41</sup>.

Results obtained with CLDN4, indicated that this molecular biomarker is probably one of the most interesting to detect the presence of free mRNA in the serum of breast cancer patients and it could be a helpful marker for the detection of cancer in serum of these patients. In addition, it has been demonstrated that increased circulating mRNA may be a valuable diagnostic tool for discriminating breast cancer patients from healthy women. Serum circulating RNA provides a new research area as biomarker for the diagnosis of breast cancer. Circulating CLDN4 mRNA was found a more interesting tumor marker than serum CA15-3 carbohydrate for the early diagnosis of breast cancer. The higher expression of CLDN4 in the patients with breast cancer than in healthy women, shows a very good diagnostic sensitivity and efficiency using RT-PCR.

In breast cancer, previous studies on claudin-4 expression performed only in immunochemistry have been contradictory. One study found that claudin-4 was expressed in

92% of breast cancers tumor biopsy and revealed no association with tumor grade, type, status of ER or PR <sup>21</sup>. An other study revealed that the expression of claudin-4 was lost in grade 1 of invasive breast tumors but increased in grades 2 and 3 <sup>25</sup>. A recent study found that the expression of claudin-4 was positively correlated with tumor grade and negatively with ER <sup>7</sup>. It was found that the expression of claudin-4 was increased in basal-like breast carcinoma <sup>16</sup>. We could not find any correlation of CLDN4-mRNA with histological type, tumor size, nodal states, tumor grade and ER, PR and Her2 status.

This study demonstrated the high interest of Claudin-4 mRNA as molecular biomarker for breast cancer diagnosis (at time of tumorectomy) with a very high sensitivity. It appeared clearly better than CA 15-3 carbohydrate measured using classical immunoassay. These results suggest that positive CLDN4 mRNA measured by real-time quantitative RT-PCR in the serum could be used to predict breast cancer and must lead to a pathological examination to confirm the diagnosis of malignity.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank M. Rehailia for statistical analysis, A. Buchmuller and F. Rancon from DRCC for methodology assistance, F. Duplat and C. Moulin for secretary assistance.

## REFERENCES:

1. Bensouda Y, Andre F, Boulet T, Al-Ghuzlan A, Conforti R, Troalen F, Bourgier C, Errihani H, Spielmann M, Delalogue S. [Prevalence of elevated serum CA 15-3 at time of metastatic relapse of breast cancer and correlation with hormone receptor status]. *Bull Cancer* 2009;96:923-8.
2. Martin A, Corte MD, Alvarez AM, Rodriguez JC, Andicoechea A, Bongera M, Junquera S, Pidal D, Allende T, Muniz JL, Vizoso F. Prognostic value of pre-operative serum CA 15.3 levels in breast cancer. *Anticancer Res* 2006;26:3965-71.
3. Suzuki M, Kato-Nakano M, Kawamoto S, Furuya A, Abe Y, Misaka H, Kimoto N, Nakamura K, Ohta S, Ando H. Therapeutic antitumor efficacy of monoclonal antibody against Claudin-4 for pancreatic and ovarian cancers. *Cancer Sci* 2009;100:1623-30.
4. Folkersen L, Kurtovic S, Razuvaev A, Agardh HE, Gabrielsen A, Paulsson-Berne G. Endogenous control genes in complex vascular tissue samples. *BMC Genomics* 2009;10:516.
5. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 2004;37:112-4, 6, 8-9.
6. Foldager CB, Munir S, Ulrik-Vinther M, Soballe K, Bunger C, Lind M. Validation of suitable house keeping genes for hypoxia-cultured human chondrocytes. *BMC Mol Biol* 2009;10:94.
7. Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, Jirstrom K, Landberg G, Martin F, Duffy MJ, Gallagher WM. Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer* 2009;124:2088-97.
8. Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, Murphy LC, Penner C, Tomes L, Young TL, Leygue E, Myal Y. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch* 2009;454:647-56.
9. Facchetti F, Lonardi S, Gentili F, Bercich L, Falchetti M, Tardanico R, Baronchelli C, Lucini L, Santin A, Murer B. Claudin 4 identifies a wide spectrum of epithelial neoplasms and represents a very useful marker for carcinoma versus mesothelioma diagnosis in pleural and peritoneal biopsies and effusions. *Virchows Arch* 2007;451:669-80.
10. Li J, Chigurupati S, Agarwal R, Mughal MR, Mattson MP, Becker KG, Wood WH, 3rd, Zhang Y, Morin PJ. Possible angiogenic roles for claudin-4 in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2009;8:1806-14.
11. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 2000;60:6281-7.
12. Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* 2004;164:1627-33.
13. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res* 2001;61:7878-81.
14. Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin. *Gastroenterology* 2001;121:678-84.
15. Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alo PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res* 2003;9:2567-75.
16. Kulka J, Szasz AM, Nemeth Z, Madaras L, Schaff Z, Molnar IA, Tokes AM. Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res* 2009;15:59-64.
17. Cunningham SC, Kamangar F, Kim MP, Hammoud S, Haque R, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Ashfaq R, Hustinx S, Heitmiller RE, Choti MA, Lillemoe KD, et al. Claudin-4, mitogen-activated protein kinase 4, and stratifin are markers of gastric adenocarcinoma precursor lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:281-7.
18. Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, Konkin T, Bhattacharya B, Britt DE, Sabo E, Moss SF. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol* 2005;36:886-92.
19. Pan XY, Wang B, Che YC, Weng ZP, Dai HY, Peng W. Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic, and malignant endometrial tissue. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:233-41.
20. Lechpammer M, Resnick MB, Sabo E, Yakirevich E, Greaves WO, Sciandra KT, Tavares R, Noble LC, DeLellis RA, Wang LJ. The diagnostic and prognostic utility of claudin expression in renal cell neoplasms. *Mod Pathol* 2008;21:1320-9.
21. Soini Y. Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Hum Pathol* 2004;35:1531-6.



22. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 2006;6:186.
23. Honda H, Pazin MJ, Ji H, Wernyj RP, Morin PJ. Crucial roles of Sp1 and epigenetic modifications in the regulation of the CLDN4 promoter in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2006;281:21433-44.
24. Cao D, Polyak K, Halushka MK, Nassar H, Kouprina N, Iacobuzio-Donahue C, Wu X, Sukumar S, Hicks J, De Marzo A, Argani P. Serial analysis of gene expression of lobular carcinoma in situ identifies down regulation of claudin 4 and overexpression of matrix metalloproteinase 9. *Breast Cancer Res* 2008;10:R91.
25. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K, Schaff Z. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* 2005;7:R296-305.
26. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
27. Oki E, Maehara Y, Tokunaga E, Shibahara K, Hasuda S, Kakeji Y, Sugimachi K. Detection of disseminated cancer cells in bone marrow of gastric cancer using real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer Lett* 2002;188:191-8.
28. Juusola J, Ballantyne J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Sci Int* 2003;135:85-96.
29. Rosi A, Guidoni L, Luciani AM, Mariutti G, Viti V. RNA-lipid complexes released from the plasma membrane of human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 1988;39:153-60.
30. Sisco KL. Is RNA in serum bound to nucleoprotein complexes? *Clin Chem* 2001;47:1744-5.
31. Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000;260:248-56.
32. Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, Lo ES, Rainer TH, Johnson PJ, Lo YM. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2002;48:1212-7.
33. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002;48:1647-53.
34. Kopreski MS, Benko FA, Gocke CD. Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:172-8.
35. Bunn PJ, Jr. Early detection of lung cancer using serum RNA or DNA markers: ready for "prime time" or for validation? *J Clin Oncol* 2003;21:3891-3.
36. Wong SC, Lo SF, Cheung MT, Ng KO, Tse CW, Lai BS, Lee KC, Lo YM. Quantification of plasma beta-catenin mRNA in colorectal cancer and adenoma patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:1613-7.
37. Bremnes RM, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer* 2005;49:1-12.
38. Li Y, Elashoff D, Oh M, Sinha U, St John MA, Zhou X, Abemayor E, Wong DT. Serum circulating human mRNA profiling and its utility for oral cancer detection. *J Clin Oncol* 2006;24:1754-60.
39. Stern-Straeter J, Bonaterra GA, Hormann K, Kinscherf R, Goessler UR. Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts. *BMC Mol Biol* 2009;10:66.
40. Bieche I, Nogues C, Paradis V, Olivi M, Bedossa P, Lidereau R, Vidaud M. Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res* 2000;6:452-9.
41. Spyrtos F, Bouchet C, Tozlu S, Labroquere M, Vignaud S, Becette V, Lidereau R, Bieche I. Prognostic value of uPA, PAI-1 and PAI-2 mRNA expression in primary breast cancer. *Anticancer Res* 2002;22:2997-3003.

**Table 1: Sequences and features of the primers used for RT-PCR**

Name	Accession	Sequence of sense and antisense primers	Localization	Length
RPLPO	NM-001002	5'-GGCGACCTGGAAGTCCAACCTAC-3' 5'-AGACAATGTGGGCTCCAAGC-3'	Exon 2-3	98 pb
CLDN4	NM-001305	5'-GCTGGCCAGGATAGCTTAACC-3' 5'-GCCAACGCCGATGCA-3'	Exon 1	54 pb

**Table 2: Parameters of the standard lines obtained for CLDN4 and RPLPO mRNA.**

Plasmids	Slope	Intercept	R2
RPLPO	-3.3	37.74	0.99
CLDN4	-3.39	38.24	0.99

**Table 3: Expression of CA15-3 and CLDN4 in serum**

<b>Diagnosis</b>	<b>Serum</b>	<b>CA15-3</b>	<b>CLDN4</b>
	number	<i>Immunoassay</i> %	<i>RT-PCR</i> %
Healthy women	30	0	1 ( <b>3</b> )
Breast cancer	118	7 ( <b>6</b> )	75 ( <b>64</b> )*

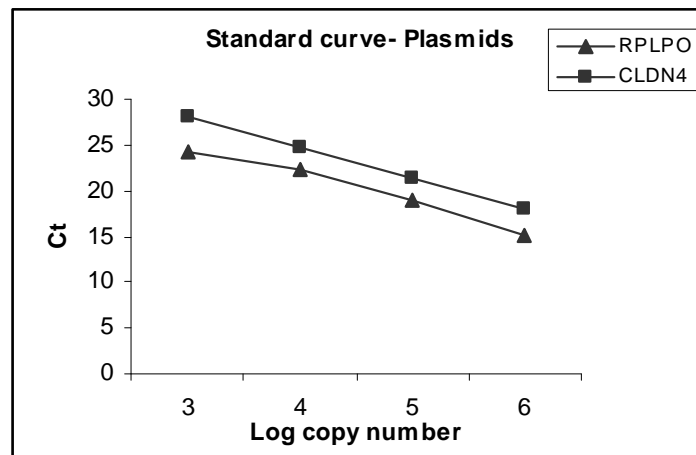
*Comparison between CLDN4 in healthy women and breast cancer : \*  $p = 0.00001$*

**Table 4:** Association of claudin 4 with clinicopathological parameters

Variable	Serum n°	CLDN4 negative n=43	CLDN4 positive n=75	Median copy number	P-value
<b>Age</b>					<b>0.047</b>
>50	91	35 (81)	56 (75)	4009	
<50	27	8 (18)	19 (25)	5285	
<b>Histological type</b>					<b>0.073*</b>
Ductal	96	38 (88)	58 (77)	3873	
Lobular	13	4 (9)	9 (12)	9618	
Mucinous	4	0	4 (5)	8684	
Ductal & Lobular	2	0	2 (3)	3668	
Ductal & Mucinous	1	0	1		
Atypical ductal hyperplasia	1	1	0		
Microcapillary carcinoma	1	0	1		
<b>Tumour size</b>					<b>0.62</b>
<2cm	70	29 (67)	41 (55)	3785	
>2cm	48	14 (32)	34 (45)	4992	
<b>Nodal status</b>					<b>0.99</b>
Negative	74	24 (56)	50 (67)	4296	
Positive	37	17 (39)	20 (27)	3741	
<b>Tumour grade</b>					<b>0.57*</b>
I	14	4 (9)	10 (23)	4528	
II	62	20 (46)	42 (56)	4765	
III	29	12 (28)	17 (23)	3829	
low	6	3 (7)	3 (4)	3064	
high	6	3 (7)	3 (4)	2395	
<b>ER status</b>					<b>0.63</b>
Negative	28	9 (21)	19 (25)	4199	
Positive	80	29 (67)	51 (68)	4150	
<b>PR status</b>					<b>0.75</b>
Negative	41	15 (35)	26 (35)	4820	
Positive	67	22 (51)	45 (60)	4198	
<b>Her2 status</b>					<b>0.75</b>
Negative	93	33 (77)	60 (80)	4198	
Positive	13	4 (9)	9 (12)	5165	

\* Kruskal-Wallis test, otherwise  $\chi^2$  test

**Fig.1: Standard curves obtained with plasmids encoding RPLPO and CLDN4.**



## Figure legends:

**Figure 1:** Each curve was obtained with different plasmid concentrations. They were constructed using data from three independent experiments by plotting the Ct (threshold cycle) value against the input cDNA concentration (serial dilutions of pDrive-vector) of samples

## Conclusion et perspectives

L'ARNm libre dans le sérum ou le plasma apparaît comme un marqueur biologique très intéressant pour la détection précoce du cancer, ne nécessitant qu'un échantillon de sang limitée. Il a donné l'occasion de supplanter les outils conventionnels pour les tumeurs infracliniques ou très petites. Par la technique de la RT-PCR, l'ARNm a été décrits comme marqueur pour identifier les patients atteints de cancer du poumon, du côlon, de la thyroïde, du mélanome et le cancer du sein (*Kopreski MS 2001 ; Bunn PJ 2003; Wong SC 2004; Bremnes RM 2005; Li Y 2006*). Sa large applicabilité est susceptible de lui donner un impact clinique de grande envergure dans un avenir proche.

La RT-PCR est devenue la méthode standard pour la quantification de l'ARNm. Dans la présente étude nous avons évalué la précision des analyses quantitatives de l'expression de l'ARNm de la claudine 4 dans le cancer du sein par RT-PCR en temps réel et RPLPO a été démontré le gène le plus stable comme gène de ménage.

Les résultats obtenus, ont indiqué que le biomarqueur CLDN4 est probablement l'un des plus intéressants pour détecter la présence d'ARNm libre dans le sérum des patients atteints de cancer du sein et il pourrait être un marqueur utile pour la détection du cancer dans le sérum.

Ainsi l'expression plus élevée de CLDN4 chez les patients atteints de cancer du sein que chez les femmes en bonne santé, montre la sensibilité et l'efficacité diagnostique en utilisant la technique de la RT-PCR.

Dans cette étude, l'ARNm circulant de la CLDN4 a été trouvé plus intéressant que le marqueur tumoral sérique CA15-3 pour le diagnostic précoce du cancer du sein.

Des études précédentes sur la claudine 4 dans le cancer du sein, étaient contradictoires. Une étude a révélé que l'expression de la claudine 4 était absente au grade 1 dans les tumeurs du sein invasives, avec une expression accrue dans les tumeurs de grades 2 et 3 (*Tokes AM 2005*). D'autres ont trouvé que la claudine 4 est surexprimée dans les carcinomes primitifs du sein par rapport à l'épithélium mammaire normal (*Kominsky SL 2004*).

Une autre étude a démontré que l'expression de la claudine 4 était corrélée positivement avec le grade de la tumeur et négativement avec ER (*Lanigan F 2009*).

Une étude réalisée sur une cohorte plus importante de patients ( $n = 184$ ) a montré que la claudine 4 était exprimée dans 92% des cancers du sein examinés et qu'elle n'était pas associée avec le grade de la tumeur, le type, le statut de ER ou RP (*Soini Y 2006*). Une étude a évalué une cohorte de 66 tumeurs de type non basal et 38 tumeurs du sein de type basal et a trouvé que l'expression de la claudine 4 était augmentée dans les tumeurs de type basal. (*Kulka J 2009*).



# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## Conclusion

Le cancer est la première cause de mortalité dans le monde industriel. Une des caractéristiques des tumeurs est leur capacité d'extension. Les cellules malignes ont un taux de prolifération supérieur et de mortalité naturelle inférieur aux cellules normales. Ceci conduit à la croissance continue du volume de la tumeur.

Une autre caractéristique des tumeurs est leur capacité invasive. Les cellules tumorales peuvent produire des enzymes détruisant les limites tissulaires. Cette croissance tumorale s'accompagne donc d'une destruction progressive des limites tissulaires normales (invasion) et de la perte d'organisation tissulaire. De plus, une faible proportion de ces cellules peut migrer dans les liquides biologiques qui drainent la tumeur : sang, lymph, épanchement inflammatoire. Les cellules migrantes peuvent essaimer dans les ganglions ou d'autres sites tissulaires et éventuellement développer des tumeurs filles (métastases).

Le diagnostic précoce d'invasion péritonéale est crucial pour la survie du patient car le traitement peut être adapté à la tumeur primitive. Le diagnostic peut être d'autant plus intéressant dans les formes très précoces, (ex bilan per-opératoire de résection tumorale) où les micro-invasions sont recherchées par lavage du résidu péritonéal.

La technique classique de détection des cellules tumorales dans les épanchements et le sang par cytologie est peu sensible, il était nécessaire de mettre au point des techniques plus performantes. L'utilisation de méthodes complémentaires (cytométrie en flux, RT-PCR quantitative en temps réel) permet de caractériser rapidement et précisément l'accessibilité des gènes d'intérêt.

Nous nous sommes intéressés à mettre au point un système de validation d'outils de détection de cellules tumorales circulantes pour identifier leur origine tissulaire, et aussi avoir distingué ces cellules des cellules inflammatoires.

Nous avons participé à l'établissement et la validation d'un système d'évaluation de l'intérêt de nouveaux marqueurs moléculaires pour détecter ce type de cellules libérée dans des prélèvements péritonéaux de patients cancéreux et de témoins atteints d'affections bénignes (cirrhose, insuffisance cardiaque) en utilisant deux techniques différents (cytométrie en flux , PCR quantitative en temps réel).

Une étude simultanée dans le sang nous permettra de savoir si ces marqueurs tumoraux sont aussi présents dans les cellules tumorales circulantes dans le plasma ou le sérum.

Nous avons donc choisi un certain nombre de marqueurs tumoraux moléculaires comme étant utiles à la détection de cellules et pouvant faire la distinction entre cellule normale inflammatoire et tumorale. De plus, certains marqueurs ont été choisis pour évaluer la spécificité d'origine tissulaire des cellules et comme indicateur de malignité, ou comme marqueur d'invasion métastatique. Ainsi ces transcripts ont été choisis pour leur intérêt à préciser le point de départ des tumeurs et qui pourraient secondairement être utilisés en multiplex. Certains marqueurs sont des molécules d'adhésion déjà bien décrites dans la littérature telle que l'épithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), le carcinoembryonic antigen (ACE), les claudines (CLDN1, 4, 7, 18), les cytokératines (CK19, 20), les mucines (MUC1 « CA15-3 », MUC16 « CA125 », MUC5AC), la villine, et la mammaglobine (MGB).

Dans nos résultats, nous avons pu dans un premier temps déterminer un gène de ménage et faire une gamme étalon par le plasmide préparé à partir de ce gène et utiliser cette gamme comme référence pour la suite. (RPLPO) a été déterminé le gène de ménage le plus stable par rapport aux autres gènes examinés (B-actine, GAPDH). Ce gène RPLPO a été utilisé pour standardiser les autres gènes cibles.

La quantification de forte expression par RT-PCR des gènes Ep-CAM ; CLDN1, 4 ; MUC1 ; CK20 et ACE a permis la caractérisation moléculaire de l'échantillon tumoral et la mise en évidence des marqueurs d'agressivité. Un seuil de positivité a pu être établi par la méthode de RT-PCR en temps réel.

Nous avons aussi montré dans nos résultats que la quantification du niveau d'ARN messager des gènes étudiés par RT-PCR quantitative à fort niveau d'expression était faisable.

Certains de ces gènes ou marqueurs tumoraux moléculaires tels qu'ACE et CLDN4 nous ont paru particulièrement utiles et susceptibles de permettre le diagnostic précoce et le suivi des patients de façon totalement non invasive. Nous avons pu obtenir du sérum de 118 patientes atteintes de cancer du sein et étudier le niveau d'expression de CLDN4 au niveau de l'ARN

messager circulant en comparaison avec des sérums de femmes en bonne santé. Ce marqueur montre son intérêt diagnostique.

Nous avons donc cherché une corrélation de l'expression de ce marqueur (CLDN4) avec les caractéristiques anatomopathologiques. Nous avons constaté que la claudine 4 était exprimée dans 64% des cancers du sein et qu'elle n'était pas associée au grade de la tumeur, les différents types histologiques, le statut de ER ou RP et Her2, par contre une différence statistiquement significative a été observée entre la CLDN4 et l'âge des patientes.

Les gènes CLDN7, MUC5AC, Villine et MGB ont un très faible niveau d'expression, ce qui semble lié à l'agressivité de la tumeur. Des essais d'optimisation seront nécessaires pour affirmer ce profil d'expression qui pourrait avoir une valeur clinique ou une valeur de classification moléculaire de différents types de cancer et ensuite participer au diagnostic du cancer (données pas montrées).

Malgré tous les essais que nous avons faits pour valider notre travail par la cytométrie en flux, nous n'avons pas pu obtenir des résultats optimisés et fiables en marquage quatre couleurs sur des échantillons pathologiques. Les résultats préliminaires montrent que les marquages sur des échantillons pathologiques sont bien moins spécifiques que sur les lignées. Nous avons notamment pu observer des marquages atypiques. La signification phénotypique et clinique de ces phénotypes aberrants reste à élucider.

Cependant, cette technique n'a pas pu être utilisée pour la réalisation de notre projet du fait de sa spécificité insuffisante.

## Perspectives

La différence des marqueurs dans les lignées cellulaires tumorales par rapport aux cellules hématopoïétiques (sang périphérique) a été nette, mais le marquage sur des échantillons pathologiques sont bien moins spécifiques que sur les lignées, car nous avons pu observer des marquages atypiques. La signification phénotypique et clinique de ces phénotypes aberrants reste à élucider. Il faut donc améliorer le protocole ou les paramètres de la cytométrie en flux notamment pour les échantillons cliniques.

Les marqueurs tumoraux moléculaires par une étude de l'ARN messager en PCR quantitative est susceptible de permettre le diagnostic précoce et le suivi des patients de façon totalement non invasive, paraissent particulièrement utiles pour le diagnostic et le pronostic des patients avec des épanchements malins et dans le sang. Ces marqueurs pourront secondairement être utilisés en multiplex surtout la CLDN4, Ep-CAM et CK20 pour améliorer l'efficacité du diagnostic

La cohorte de patients avec des épanchements malins a été importante, mais il semble nécessaire d'augmenter la taille de l'échantillon analysé, afin de pouvoir faire des analyses statistiques stratifiées.

Il semblerait intéressant d'étudier une cohorte de tumeurs péritonéales primitives, afin d'en permettre la détection précoce.

Nous avons utilisé l'ARN messager circulant dans le sérum comme nouvel outil de diagnostic qui permet d'améliorer la détection précoce. Il semblerait intéressant de continuer à étudier tel ce type de marqueur pour la détection précoce du cancer, pour le diagnostic et le suivi des patients.

# **BIBLIOGRAPHIE**

**Agarwal R**, D'Souza T, Morin PJ. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* 2005; **65**:7378-85.

**Alix-Panabieres C**, Brouillet JP, Fabbro M, et al. Characterization and enumeration of cells secreting tumor markers in the peripheral blood of breast cancer patients. *J. Immunol Methods* 2005; **299**:177-88.

**Allan AL**, Keeney M. Circulating tumor cell analysis: technical and statistical considerations for application to the clinic. *J Oncol*. 2010; **2010**:42618.

**Alquobaili F**, Miller SA, Muhie S, et al. Estrogen receptor-dependent genomic expression profiles in breast cancer cells in response to fatty acids. *J Carcinog*. 2010; **4**:8:17.

**Andrianifahanana M**, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1765**:189-222.

**Anido J**, Scaltriti M, Bech Serra JJ, et al. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J* 2006; **25**:3234-44.

**Antoniou A**, Pharoah PD, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003; **72**:1117-1130.

**Baeuerle PA**, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Brit J Cancer* 2007; **96**:417-23.

**Balzar M**, Bakker HA, Briaire-de-Buijn IH, et al. Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* 1998; **18**:4833-43.

**Balzar M**, Prins FA, Bakker HA, et al. The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res* 1999; **246**:108-21.

**Bensouda Y**, Andre F, Boulet T, et al. Prevalence of elevated serum CA 15-3 at time of metastatic relapse of breast cancer and correlation with hormone receptor status. *Bull Cancer* 2009; **96**: 923-8.

**Bertucci F**, Nasser V, Houlgatte R, et al. Profils d'expression génique par puces à ADN dans les cancers du sein : intérêt pronostique. *Bull Cancer* 2002; **89** : 571-4.

**Bosch A**, Eroles P, Zaragoza R, et al. Triple-negative breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev* 2010.

**Bremnes RM**, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer* 2005; **49**: 1-12.

**Brenner S**, Johnson M, Bridgham J, et al. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol* 2000; **18**: 630-634.

**Brock MV**, Hooker CM, Yung R, et al. Can we improve the cytologic examination of malignant pleural effusions using molecular analysis? *Ann Thorac Surg* 2005; **80**:1241-7.

**Brown NM**, Stenzel TT, Friedman PN, et al. Evaluation of expression based markers for the detection of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; **97**:41-7.

**Bunn PJ**, Jr. Early detection of lung cancer using serum RNA or DNA markers: ready for "prime time" or for validation? *J Clin Oncol* 2003; **21**: 3891-3.

**Burgess AW**, Cho HS, Eigenbrot C, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; **12**:541-52.

**Bustin SA**, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sc* 2005; **109**:365-79.

**Buzdar AU**, Ibrahim NK, Francis D, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; **23**:3676-85.

**Buzdar AU**, Valero V, Ibrahim NK, et al. Neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy and concurrent trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: an update of the initial randomized study population and data of additional patients treated with the same regimen. *Clin Cancer Res* 2007; **13**:228-33.

**Calaluze R**, Miedema BW, Yesus YW. Micrometastasis in colorectal carcinoma: a review. *J Surg Oncol* 1998; **67**:194-202.

- Carletti AM**, Roncella S, Canessa PA, et al. Expression of human mammaglobin gene in pleural effusions of patients with malignant mesothelioma. *Thorax* 2006; **61**:271.
- Chan K C A**, Lo Y M D. Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers. *Brit J Cancer* 2007; **96**: 681 – 685.
- Chen CC**, Hou MF, Wang JY, et al. Simultaneous detection of multiple mRNA markers CK19, CEA, c-Met, Her2/neu and hMAM with membrane array, an innovative technique with a great potential for breast cancer diagnosis. *Cancer Lett* 2006; **240**:279–88.
- Chen XQ**, Bonnefoi H, Pelte MF, et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; **6**:3823-6.
- Cheung ST**, Leung KL, Ip YC, et al. Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:551-6.
- Ciampa A**, Fanger G, Khan A, et al. Mammaglobin and CRxA-01 in pleural effusion cytology: potential utility of distinguishing metastatic breast carcinomas from other cytokeratin 7-positive/cytokeratin 20-negative carcinomas. *Cancer* 2004; **102**:368-72.
- Cimino A**, Halushka M, Illei P, et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is overexpressed in breast cancer metastases. *Breast Cancer Res Treat.* 2009.
- Colditz GA**, Rosner BA, Chen WY, et al. Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst.* 2004; **96**:218-28.
- Cole CN**, Scarcelli JJ. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;**18**:299-306.
- Czerniak B**, Papenhausen PR, Herz F, et al. Flow cytometric identification of cancer cells in effusions with Ca1 monoclonal antibody. *Cancer* 1985; **55**:2783-2788.
- Daskalaki A**, Agelaki S, Perraki M, et al. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 2009; **101**:589-97.
- Davidson B**, Risberg B, Kristensen G, et al. Detection of cancer cells in effusions from patients diagnosed with gynaecological malignanciesEvaluation of five epithelial markers. *Virchows Archiv* 1999; **435**: 43-49.
- Davidson B**, Dong HP, Berner A, et al. Detection of malignant epithelial cells in effusions using flow cytometric immunophenotyping: an analysis of 92 cases. *Am J. Clin Pathol.* 2002; **118**:85-92.
- Davidson B**, Goldberg I, Reich R, et al. AlphaV- and beta1-integrin subunits are commonly expressed in malignant effusions from ovarian carcinoma patients. *Gynecol Oncol* 2003; **90**:248-57.
- Davidson B**, Lazarovici P, Ezersky A, et al. Expression levels of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 in effusions and solid tumors of serous ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2001; **7**:3457-64.
- Davidson B**, Risberg B, Berner A, et al. The biological differences between ovarian serous carcinoma and diffuse peritoneal malignant mesothelioma. *Semin Diagn Pathol* 2006; **23**:35-43.
- De Boer CJ**, Van Dorst E, Van Krieken H, et al. Changing roles of cadherins and catenins during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix. *Am J Pathol* 1999; **155**:505-15.
- Decremoux P**, Extra J.M. Detection of MUC1 – expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by Real – time polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2000; **6**:3117-22.
- Dekker J**, Rossen JW, Buller HA, et al. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci* 2002;**27**:126-31.
- Dheda K**, Huggett JF, Bustin SA, et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 2004; **37**:112-4.
- Dong HP**, Holth A, Berner A, et al. Flow cytometric immunphenotyping of epithelial cancer cells in effusions-Technical considerations and pitfalls. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; **72**:332-43.
- Duffy MJ**. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; **47**: 624-30.
- Eidelman FJ**, Fuks A, DeMarte L, et al. Human carcinoembryonic antigen an intercellular adhesion molecule blocks fusion and differentiation of rat myoblasts. *J Cell Biol* 1993; **123**: 467-75.



- EL-Habashi A**, El Morsi B, Freeman SM, et al. Tumor oncogenic expression in malignant effusion as a possible method to enhance cytologic diagnostic sensitivity - An immunocytochemical study of 87 cases. *Am J Clin Pathol* 1995; **103**:206-14.
- Fabisiewicz A**, Kulik J, Kober P, et al. Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Acta Biochim Pol* 2004; **51**:747-55.
- Facchetti F**, Lonardi S, Gentili F, et al. Claudin 4 identifies a wide spectrum of epithelial neoplasms and represents a very useful marker for carcinoma versus mesothelioma diagnosis in pleural and peritoneal biopsies and effusions. *Virchows Arch* 2007; **451**:669-80.
- Fiegl M**, Haun M, Massoner A, et al. Combination of cytology, fluorescence in situ hybridization for aneuploidy, and reverse-transcriptase polymerase chain reaction for human mamaglobin/mamaglobin B expression improves diagnosis of malignant effusions. *J Clin Oncol* 2004; **22**:474-83.
- Ford D**, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1998; **62**:676–689.
- Fu XD**, Goglia L, Sanchez AM, et al. Progesterone receptor enhances breast cancer cell motility and invasion via extra-nuclear activation of focal adhesion kinase. *Endocr Relat Cancer.* 2010 Mar 8)
- Fukumoto Y**, Ikeguchi M, Matsumoto S, et al. Detection of cancer cells and gene expression of cytokines in the peritoneal cavity in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006; **9**:271-6.
- Garrett TP**, McKern NM, Lou M, et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; **11**:495-505.
- George SP**, Wang Y, Mathew S, et al. Dimerization and actin-bundling properties of villin and its role in the assembly of epithelial cell brush borders. *J Biol Chem* 2007; **282**:26528-41.
- Gibson UE**, Heid CA, Williams PM. A novel method for real-time RT-PCR. *Genome Res* 1996; **6**:995-1001.
- Goldstein MJ**, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest* 2005; **23**:338-51.
- Gradilone A**, Gazzaniga P, Silvestri I, et al. Detection of CK19, CK20 and EGFR mRNAs in peripheral blood of carcinoma patients: correlation with clinical stage of disease. *Oncol Rep* 2003; **10**:217–22.
- Greenman C**, Stephens P, Smith R, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007; **446**:153-8.
- Gross HJ**, Verwer B, Houck D, et al. Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as  $10^{-7}$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**:537-41.
- Grünewald K**, Haun M, Fiegl M, et al. Mammoglobin expression in gynecologic malignancies and malignant effusions detected by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Lab Invest* 2002; **82**:1147-53.
- Guadagni F**, Kantor J, Aloe S, et al. Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analysis and demonstration of its potential importance as a adjunct to multiple serum markers. *Cancer Res* 2001; **61**:2523-32.
- Halicka HD**, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; **260**:248-56.
- Hammarstrom S**. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structure, suggested functions and expression in normal and malignant tissue. *Semin Cancer Biol* 1999; **9**:67–81.
- Harada Y**, Ohuchi N, Ishida T, et al. Tumor markers in breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001; **28**:1035-40.
- Harris L**, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007; **25**:5287-312.
- Hartman M**, Baruch A, Ron I, et al. MUC1 isoform specific monoclonal antibody 6 E6/2 detects preferential expression of the novel MUC1/Y protein in breast and ovarian cancer. *Int J Cancer* 1999; **82**: 256-267.
- Harvey JM**, Clark GM, Osborne CK, et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; **17**:1474-81.
- Hassan R**, Remaley AT, Sampson ML, et al. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; **12**:447-53.

- Hasselmann DO**, Rappl G, Tilgen W, et al. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* 2001; **47**:1488-9.
- Hernández L**, Nuñez-Villar MJ, Martínez-Arribas F, et al. Circulating hormone levels in breast cancer patients correlation with serum tumor markers and the clinical and biological features of the tumors. *Anticancer Res* 2005; **25**:451-4.
- Hewitt KJ**, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 2006; **6**:186.
- Higuchi R**, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; **11**:1026-30.
- Hinoda Y**, Imai K. Carcinoembryonic antigen gene family and its clinical application. *Gan To Kagaku Ryoho* 1990; **17**:1274-80.
- Ho HN**, Wu MY, Yang YS. Peritoneal cellular immunity and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1997; **38**:400-12.
- Hruban RH**, Offerhaus GJ. Molecular diagnosis of cancer and micrometastases. *Adv Anat Pathol* 1998; **5**:175-8.
- Hsieh SY**, Chiu CT, Sheen IS, et al. A clinical study on pseudomyxoma peritonei. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; **10**:86-91.
- Hutton RL**, Dalton SR. Primary peritoneal serous borderline tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2007; **131**:138-44.
- Ignatiadis M**, Perraki M, Apostolaki S, et al. Molecular detection and prognostic value of circulating cytokeratin-19 messenger RNA-positive and HER2 messenger RNA-positive cells in the peripheral blood of women with early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2007; **7**:883-9.
- Ignatiadis M**, Georgoulas V, Mavroudis D. Circulating tumor cells in breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2008; **20**:55-60.
- Ito S**, Nakanishi H, Kodera Y, et al. Prospective validation of quantitative CEA mRNA detection in peritoneal washes in gastric carcinoma patients. *Br J Cancer* 2005; **93**:986-92.
- Jahr S**, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; **61**:1659-65.
- Jia Y**, Persson C, Hou L, et al. A comprehensive analysis of common genetic variation in MUC1, MUC5AC, MUC6 genes and risk of stomach cancer. *Cancer Causes Control* 2010; **21**:313-21.
- Jongeneel CV**, Iseli C, Stevenson BJ, et al. Comprehensive sampling of gene expression in human cell lines with massively parallel signature sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100** : 4702-4705.
- Jung M**, Jeung HC, Lee SS, et al. The clinical significance of ascitic fluid CEA in advanced gastric cancer with ascites. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; **136**: 517-26.
- Kamangar F.**, Dores G.M., Anderson W.F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006; **24**:2137–2150.
- Kiyoko F.** Aoki-Kinoshita. An Introduction to Bioinformatics for Glycomics Research. *PLoS Comput. Biol.* 2008; **4**: e1000075 .
- Klapper LN**, Vaisman N, Hurwitz E, et al. A subclass of tumor-inhibitory monoclonal antibodies to ErbB-2/HER2 blocks crosstalk with growth factor receptors. *Oncogene*. 1997; **14**:2099-109.
- Kodera Y**, Nakanishi H, Ito S, et al. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: detection of cytokeratin 20 mRNA in peritoneal washes, in addition to detection of carcinoembryonic antigen. *Gastric Cancer* 2005; **8**:142-8.
- Kominsky SL**, Vali M, Korz D, et al. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* 2004; **164**:1627-33.
- Kominsky SL**. Claudins: emerging targets for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* 2006; **8**:1-11.
- Koppe MJ**, Boerman OC, Oyen WJ, et al. Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies. *Ann Surg* 2006; **243**:212-22.
- Kopreski MS**, Benko FA, Gocke CD. Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum. *Ann N Y Acad Sci* 2001; **945**: 172-8.

- Kopreski MS**, Benko FA, Kwak LW, et al. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999; **5**:1961-5.
- Kramer F**, White K, Kubbies M, et al. Genomic organisation of claudin 1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum Genet* 2000; **107**:249-56.
- Krause G**, Winkler L, Mueller SL, et al. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1778**:631-45.
- Kulka J**, Szász AM, Németh Z, et al. Expression of Tight Junction Protein Claudin-4 in Basal-Like Breast Carcinomas. *Pathol Oncol Res* 2009; **15**:59-64.
- Kulka J**, Tökés AM, Kaposi-Novák P, et al. Detection of HER-2/neu Gene Amplification in Breast Carcinomas Using Quantitative Real-time PCR – A Comparison with Immunohistochemical and FISH Results. *Pathol Oncol Res* 2006; **12/4** :0197
- Lanigan F**, McKiernan E, Brennan DJ, et al. Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer* 2009; **124**: 2088-97.
- Lee HS**, Lee HK, Kim HS, et al. MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas. *Cancer* 2001; **92**:1427-34.
- Lee MJ**, Lee HS, Kim WH, et al. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Mod Pathol* 2003; **16**: 403-10.
- Levitin F**, Baruch A. A novel protein derived from the MUC1 gene by alternative splicing and frameshifting. *J Biol Chem* 2005; **280**:10655-63.
- Li G**, Lambert C, Gentil-Perret A, et al. Molecular and cytometric analysis of renal carcinoma cells. Concepts, techniques and prospects. *Prog Urol* 2003; **13**:1-13.
- Li Y**, Elashoff D, Oh M, et al. Serum circulating human mRNA profiling and its utility for oral cancer detection. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 1754-60.
- Liebermann DA**, Hoffman B, Steinman RA. Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p 53-dependent and independent pathways. *Oncogene* 1995; **11**:199-210.
- Ligtenberg MJ**, Kruijshaar L, Buijs F, et al. Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor. *J Biol Chem* 1992; **267**:6171-7.
- Lim TS**, Vedula SR, Kausalya PJ, et al. Single-molecular-level study of claudin-1-mediated adhesion. *Langmuir* 2008; **24**:490-5.
- Litvinov SV**, Bakker HA, Gourevitch MM, et al. Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun* 1994; **2**:417-28.
- Litvinov SV**, van Driel W, Van Rhijn CM, et al. Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol* 1996; **148**:865-75.
- Litvinov SV**, Velders MP, Bakker HAM, et al. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1994; **25**:437-46.
- Lledó SM**, Garcia-Granero E, Dasí F, et al. Real time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2004; **6**:236-42.
- Lloyd JM**, McIver CM, Stephenson SA, et al. Identification of early-stage colorectal cancer patients at risk of relapse post-resection by immunobead reverse transcription-PCR analysis of peritoneal lavage fluid for malignant cells. *Clin Cancer Res* 2006; **12**:417-23.
- Lostumbo A**, Mehta D, Setty S, et al. Flow cytometry: A new approach for the molecular profiling of breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2006; **80**:46-53.
- Loy TS**, Sharp SC, Andershock CJ, et al. Distribution of CA19-9 in adenocarcinomas and transitional cell carcinomas. An immunohistochemical study of 527 cases. *Am J Clin Pathol* 1993; **99**:726-728.
- Lozano MD**, Panizo A, Toledo GR, et al. Immunocytochemistry in the Differential Diagnosis of Serous Effusions. *Cancer Cytopathol* 2001; **93**:68 –72.
- Lugli A**, Tzankov A, Zlobec I, et al. Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by mismatch repair status. *Mod Pathol* 2008; **21**:1403-12.

- Lumachi F**, Basso SM, Brandes AA, et al. Relationship between tumor markers CEA and CA15-3, TNM staging, estrogen receptor rate and MIB-1 index in patients with PT1-2 breast cancer. *Anticancer Res* 2004; **24**: 3221-4.
- Maccioni M**, Riera CM, Rivero VE. Identification of rat prostatic steroid binding protein (PSBP) as an immunosuppressive factor. *J Reprod Immunol* 2001; **50**:133-49.
- Magnani JL**. The discovery, biology, and drug development of sialyl Lea and sialyl Lex. *Arch Biochem Biophys* 2004; **426**:122-31.
- Makino T**, Yamasaki M, Takeno A, et al. Cytokeratins 18 and 8 are poor prognostic markers in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Cancer* 2009; **101**:1298-306.
- Manning-LS**, Whitaker-D, Murch-AR, et al. Establishment and characterization of five human malignant mesothelioma cell lines derived from pleural effusions. *Int J Cancer* 1991; **47**:285-90.
- Marrakchi R**, Ouerhani S, Benammar S, et al. Detection of cytokeratin 19 mRNA and CYFRA 21-1 (cytokeratin 19 fragments) in blood of Tunisian women with breast cancer. *Int J Biol Markers* 2008; **23**:238-43.
- Martin A**, Corte MD, Alvarez AM, et al. Prognostic value of pre-operative serum CA 15.3 levels in breast cancer. *Anticancer Res* 2006; **26**:3965-71.
- Mathelin C**, Koehl C, Rio MC. Circulating proteinic biomarkers and breast cancer. *Gynecol Obstet Fertil* 2006; **34**:638-46.
- McCluggage WG**, Wilkinson N. Metastatic neoplasms involving the ovary: a review with an emphasis on morphological and immunohistochemical features. *Histopathology* 2005; **47**:231-47.
- McLaughlin R**, McGrath J, Grimes H, et al. The prognostic value of the tumor marker CA15-3 at initial diagnosis of patients with breast cancer. *Int J Biol markers* 2000; **15**:340-2.
- McLemore MR**, Aouizerat B. Introducing the MUC16 gene: implications for prevention and early detection in epithelial ovarian cancer. *Biol Res Nurs* 2005; **6**:262-7.
- Michl P**, Buchholz M, Rolke M, et al. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin. *Gastroenterology* 2001; **121**:678-84.
- Miki Y**, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994; **266**:66-71.
- Miksicek RJ**, Myal Y, Watson PH, et al. Identification of a novel breast and salivary gland – specific, Mucin –like gene strongly expressed in normal and tumor human mammary epithelium. *Cancer Res* 2002; **62**:2736-40.
- Mohanty SK**, Dey P. Serous effusions: diagnosis of malignancy beyond cytomorphology. An analytic review. *Postgrad Med J* 2003; **79**:569-74.
- Molina MA**, Saez R, Ramsey EE, et al. NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; **8**:347-53.
- Moll R**, Robine S, Dudouet B, et al. Villin: a cytoskeletal protein and a differentiation marker expressed in some human adenocarcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1987; **54**:155-69.
- Monte SA**, Ehya H, Lang WR. Positive effusion cytology as the initial presentation of malignancy. *Acta Cytol* 1987; **31**:448-52.
- Moriarty AT**, Wiersema L, Snyder W, et al. Immunophenotyping of cytologic specimens by flow cytometry. *Diagn Cytopathol* 1993; **9**:252-258.
- Morin PJ**. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 2005; **65**:9603-6.
- Munz M**, Zeidler R, Gires O. The tumour-associated antigen EpCAM upregulates the fatty acid binding protein E-FABP. *Cancer Lett* 2005; **225**:151-7.
- Nagel H**, Werner C, Hemmerlein B. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for GA733-2 mRNA in the detection of metastatic carcinoma cells in serous effusions. *Am J Clin Pathol* 2003; **120**:888-901.
- Nakanishi H**, Kodera Y, Yamamura Y, et al. Rapid quantitative detection of carcinoembryonic antigen-expressing free tumor cells in the peritoneal cavity of gastric-cancer patients with real-time RT-PCR on the lightcycler. *Int J Cancer*. 2000; **89**:411-7.
- Nance-KV**; Silverman-JF. Immunocytochemical panel for the identification of malignant cells in serous effusions. *Am J Clin Pathol* 1991; **95**:867-74.

**Ng EK**, Tsui NB, Lam NY, et al. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2002; **48**:1212-7.

**Nicolini A**, Tartarelli G, Carpi A, et al. Intensive post-operative follow-up of breast cancer patients with tumour markers: CEA, TPA or CA15.3 vs MCA and MCA-CA15.3 vs CEA-TPA-CA15.3 panel in the early detection of distant metastases. *BMC Cancer* 2006; **6**:269.

**Noack F**, Schmitt M, Bauer J, et al. A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications. *Int J Biol Markers* 2000; **15**:100-4.

**Normanno N**, Bianco C, De Luca A, et al. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer*. 2003; **10**:1-21

**Nusbaum R**, Isaacs C. Management updates for women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Mol Diagn Ther*. 2007;**11**:133-44.

**Obermair A**, Schmid BC.Expression of MUC1 splice variants in benign and malignant ovarian tumours. *Int J cancer* 2002; **100**: 166-171.

**Oosterlynck DJ**, Meuleman C, Waer M, et al. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; **58**:290-5.

**Oral E**, Olive DL, Arici A. The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996; **2**:385-98.

**Osta WA**, Chen Y, Mikhitarian K, et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 2004; **64**:5818-24.

**Park SY**, Kim BH, Kim JH, et al. Panels of Immunohistochemical Markers Help Determine Primary Sites of Metastatic Adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2007; **131**:1561–1567 .

**Passebosch-Faure K**, Li G, Lambert C, et al. Evaluation of a panel of molecular markers for the diagnosis of malignant serous effusions. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:6862-7.

**Patton S**, Gendler SJ, Spicer AP. The epithelial mucin, MUC1 of milk mammary gland and other tissues. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1241**:407-23.

**Pauli C**, Munz M, Kieu C, et al. Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett* 2003; **193**:25-32.

**Pease AC**, Solas D, Sullivan EJ, et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**: 5022-5026.

**Polyak K**. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 2007; **117**: 3155–3163.

**Prasad NB**, Biankin AV, Fukushima N, et al. Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res* 2005, **65**:1619-26.

**Prat J**. Ovarian carcinomas, including secondary tumors: diagnostically challenging areas. *Mod Pathol*. 2005; **2**:S99-111.

**Press MF**, Pike MC, Hung G, et al. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res*. 1994; **54** :5675-82.

**Racila E**, Euhus D, Weiss AJ, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**:4589-94.

**Raj GV**, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer*. 1998, **82**: 1419-42.

**Rangel LB**, Agarwal R, D'Souza T, et al. Tight Junction Proteins Claudin-3 and Claudin-4 Are Frequently Overexpressed in Ovarian Cancer but Not in Ovarian Cystadenomas. *Clin Cancer Res* 2003; **9**:2567-75.

**Rastelli F**, Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori*. 2008; **94**:370-83.

**Resnick MB**, Konkin T, Routhier J, et al. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 2005; **18**:511-8.

- Ri G**, Ohno S, Yamamoto T, et al. Serum levels of CA15-3, KL-6 and BCA225 are positively correlated with each other in the general population. *Anticancer Res* 2009; **29**:4239-42.
- Rijken A**, Dekker A, Taylor S, et al. Diagnostic value of DNA analysis in effusions by flow cytometry and image analysis. A prospective study on 102 patients as compared with cytologic examination. *Am J Clin Pathol*. 1991; **95**:6-12.
- Risberg B**, Davidson B, Dong HP, et al. Flow cytometric immunophenotyping of serous effusions and peritoneal washings :comparison with immunochemistry and morphological findings. *J Clin Pathol* 2000; **53**:513-517.
- Ross JS**, Fletcher JA. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist*. 1998; **3**:237-252.
- Saez R**, Molina MA, Ramsey EE, et al. p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; **12**:424-31.
- Saha I**, Dey P, Vhora H, et al. Role of DNA flow cytometry and image cytometry on effusion fluid. *Diagn Cytopathol*. 2000; **22**:81-5
- Sakaguchi M**, Virmani AK, Ashfaq R, et al. Development of a sensitive, specific reverse transcriptase polymerase chain reaction-based assay for epithelial tumour cells in effusions. *Br J Cancer* 1999; **79**:416-22.
- Sanada Y**, Oue N, Mitani Y, et al. Downregulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J Pathol* 2006; **208**:633-42.
- Sasaki E**, Tsunoda N, Hatanaka Y, et al. Breast-specific expression of MGB1/mammaglobin: an examination of 480 tumors from various organs and clinicopathological analysis of MGB1-positive breast cancers. *Modern Pathology* 2007; **20**:208-14.
- Scaltriti M**, Rojo F, Ocana A, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; **99**:628-38.
- Schena M**, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 10614-10619.
- Schlessinger J**. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000; **103**:211-25.
- Schmid BC**, Buluwela L, Liu Q, et al. Expression of MUC1 splice variants correlates with invasive growth of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2002; **76**:211-9.
- Schmidt DS**, Klingbeil P, Schnolzer M, et al. CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM. *Exp Cell Res* 2004; **297**:329-47.
- Schmidt P**, Thiele M, Rudroff C, et al. Detection of tumor cells in peritoneal lavages from patients with gastrointestinal cancer by multiplex reverse transcriptase PCR. *Hepatogastroenterology* 2001; **48**:1675-9.
- Senapati S**, Das S, Batra SK. Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics. *Trends Biochem Sci*. 2009
- Seregni E**, Botti C, Massaron S, et al. Mucinous markers in breast cancer. *Tumori* 1997; **83**:550-1 /b
- Seregni E**, Botti C, Massaron S, et al. Structure, function and gene expression of epithelial mucins. *Tumori* 1997; **83**:625-32 /a
- Shen C**, Hu L, Xia L, et al. Quantitative Real-time RT-PCR Detection for Survivin, CK20 and CEA in Peripheral Blood of Colorectal Cancer Patients. *Jpn J Clin Oncol* 2008; **38**:770-776
- Sigstad E**, Dong HP, Nielsen S, et al. Quantitative analysis of integrin expression in effusions using flow cytometric immunophenotyping. *Diagn Cytopathol* 2005; **33**:325-31.
- Sikaroodi M**, Galachiantz Y, Baranova A. Tumor markers: the potential of "omics" approach. *Curr Mol Med*. 2010; **10**:249-57.
- Silva JM**, Dominguez G, Garcia JM, et al. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1999; **59**:3251-6.
- Sjodin A**, Guo D, Hofer PA, et al. Mammaglobin in normal human sweat glands and human sweat gland tumors. *J Invest Dermatol* 2003; **121**:428-9.
- Smorodinsky N**, Weiss M, Hartmann ML, et al. Detection of a secreted MUC1/SEC protein by MUC1 isoform specific monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **228**: 115-21.

- Soini Y**, Talvensaari-Mattila A. Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 in ovarian tumors of diverse types. *Int J Gynecol Pathol* 2006; **25**:330-5.
- Soini Y**. Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Hum Pathol* 2004; **35**:1531-6
- Spizzo G**, Went P, Dirnhofer S, et al. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004; **86**:207-13.
- Spizzo G**, Went P, Dirnhofer S, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006; **103**:483-8.
- Srivastava S**. "Move over proteomics, here comes glycomics". *J. Proteome Res.* 2008 ; **7** (5): 1799.
- Swisshelm K**, Macek R, Kubbies M: Role of claudins in tumorigenesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; **57**:919-28.
- Tamura N**, Iinuma H, Takada T. Prospective study of the quantitative carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20 mRNA detection in peritoneal washes to predict peritoneal recurrence in gastric carcinoma patients. *Oncol Rep* 2007; **17**:667-72.
- Tarp MA**, Sørensen AL, Mandel U, et al. Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat. *Glycobiology* 2007; **17**:197-209.
- Thind A**, Diamant A, Hoq L, et al. Method of detection of breast cancer in low-income women. *J Womens Health (Larchmt)*. 2009; **18**:1807-11.
- Thomas E**, Hortobagyi GN. New paradigms in adjuvant systemic therapy of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2003; **10**:75-89.
- Thomas P**, Toth CA, Saini KS, et al. The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1032**:177-89.
- Thompson JA**, Grunert F, Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 1991; **5**:344-66.
- Tokés AM**, Kulka J, Paku S, et al. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* 2005; **7**:R296-305.
- Trzpis M**, McLaughlin P, de Leij L, et al. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 2007; **171**:386-395.
- Tsui NB**, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002; **48**:1647-53.
- Tsukita S**, Furuse M. Pores in the wall claudins constitutes tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 2000; **149**:13-6 /b
- Tsukita S**, Furuse M. The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **915**:129-35 /a
- Ueda J**, Iwata T, Ono M, et al. Comparison of three cytologic preparation methods and immunocytochemistries to distinguish adenocarcinoma cells from reactive mesothelial cells in serous effusion. *Cytopathol.* 2006; **34**:6-10
- Uyei A**, Peterson SK, Erlichman J, et al. Association between clinical characteristics and risk-reduction interventions in women who underwent BRCA1 and BRCA2 testing: a single-institution study. *Cancer.* 2006; **107**:2745-51.
- Van der Auwera I**, Peeters D, Benoy IH, et al. Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2010; **102**:276-84.
- Velculescu VE**, Zhang L, Vogelstein B, et al. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995, **270**: 484-487.
- Wang JY**, Lin SR, Lu CY, et al. Gastric cancer cell detection in peritoneal lavage: RT-PCR for carcinoembryonic antigen transcripts versus the combined cytology with peritoneal carcinoembryonic antigen levels. *Cancer Lett* 2005; **223**:129-35.
- Wang JY**, Wu CH, Lu CY, et al. Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis. *World J Surg* 2006; **30**:1007-13.

- Wang SC**, Lien HC, Xia W, et al. Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell* 2004; **6**:251-61.
- Wang Z**, Zhang X, Xu H, et al. Detection of peritoneal micrometastasis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for heparanase mRNA and cytology in peritoneal wash samples. *J Surg Oncol* 2005; **90**:59-65.
- Watson MA**, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res* 1996; **56**:860-5.
- Wieczorek AJ**, Rhyner C, Block LH. Isolation and characterization of an RNA-proteolytic complex associated with the malignant state in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**:3455-9.
- Winter MJ**, Nagtegaal ID, van Krieken JH, et al. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 2003; **163**:2139-48.
- Wolfrum F**, Vogel I, Fandrich F, et al. Detection and clinical implications of minimal residual disease in gastrointestinal cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2005; **390**:430-41.
- Wong SC**, Lo SF, Cheung MT, et al. Quantification of plasma beta-catenin mRNA in colorectal cancer and adenoma patients. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 1613-7.
- Wooster R**, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994; **265**:2088-90.
- Xenidis N**, Perraki M, Kafousi M, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006; **24**:3756-62.
- Xi L**, Luketich JD, Raja S, et al. Molecular staging of lymph nodes from patients with esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:4128-35.
- Xu D**, Li XF, Zheng S, et al. Quantitative real-time RT-PCR detection for CEA, CK20 and CK19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; **7**:445-51.
- Xu F**, Chen J, Shen HH, et al. The diagnostic significance of the detection of cytokeratin 19 mRNA by quantitative RT-PCR in benign and malignant pleural effusions. *J Zhejiang Univ Sci* 2004; **5**:1286-9.
- Yakes FM**, Chinratanalab W, Ritter CA, et al. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res*. 2002; **62**:4132-41.
- Yamamoto M**, Baba H, Toh Y, et al. Peritoneal lavage CEA/CA125 is a prognostic factor for gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; **133**:471-6.
- Yeh CS**, Wang JY, Wu CH, et al. Molecular detection of circulating cancer cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer by using membrane array with a multiple mRNA marker panel. *Int J Oncol* 2006; **28**:411-20.
- Yu CJ**, Shew JY, Liaw YS, et al. Application of mucin quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction in assisting the diagnosis of malignant pleural effusion. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164**:1312-8.
- Zafrakas M**, Petschke B, Donner A, et al. Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies. *BMC Cancer* 2006; **9**: 6-88.
- Zehentner BK**, Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clin Biochem* 2004; **37**:249-57.
- Zehentner BK**, Persing DH, Deme A, et al. Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker: multigene reverse transcription-PCR assay and sandwich ELISA. *Clin Chem* 2004; **50**:2069-76 /b
- Zhang KH**, Cao F, Fu QB, et al. Detection of mRNAs of GA733 Genes by RT-PCR in Exfoliated Cells of Pleural and Peritoneal Effusions and Its Clinical Values. *Int Med* 2007; **46**:1489-94.
- Zhang YS**, Xu J, Luo GH, et al. Detection of carcinoembryonic antigen mRNA in peritoneal washes from gastric cancer patients and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2006; **12**:1408-1411.
- Zieglschmid V**, Hollmann C, Böcher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005; **42**:155-96.